



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

ANÁLISIS DE LA VARIACIÓN Y LA ESTRUCTURA
GENÉTICA DE LA CENTOLLA (*Lithodes santolla*,
Molina, 1782) EN LA REGIÓN DE MAGALLANES Y
ANTÁRTICA CHILENA, MEDIANTE MARCADORES
MOLECULARES.

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación Acuicultura)

Presenta

Martha Guadalupe Barrera García

La Paz, Baja California Sur, Agosto de 2016.

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12:00 horas del día 22 del Mes de Agosto del 2016, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"Análisis de la variación y la estructura genética de la centolla (*Lithodes santolla*) en la Región de Magallanes y Antártica Chilena, mediante marcadores moleculares".


Presentada por el alumno:

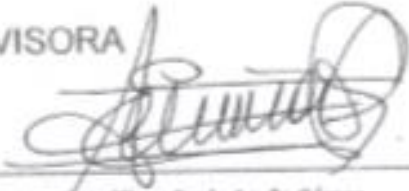
Martha Guadalupe Barrera García

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN **Acuicultura**

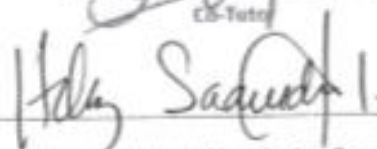
Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA


Dra. Guadalupe Fabiola Arcos Ortega
Director de Tesis


Dra. Eliana Paola Acuña Gómez
Co-Tutor


Dr. Sergio Francisco Flores Ramirez
Co-Tutor


Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra,
Directora de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos

COMITÉ TUTORIAL

Director de Tesis:

Dra. Guadalupe Fabiola Arcos Ortega
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste de México, S. C.,
La Paz, B.C.S.

Co-Tutor:

Dra. Eliana Paola Acuña Gómez
Centro Científico Regional Fundación CEQUA, Chile

Co-Tutor:

Dr. Sergio Francisco Flores Ramírez
Universidad Autónoma de Baja California Sur, La Paz, B.C.S

COMITÉ REVISOR DE TESIS

Dra. Guadalupe Fabiola Arcos Ortega

Dra. Eliana Paola Acuña Gómez

Dr. Sergio Francisco Flores Ramírez

JURADO DEL EXAMEN DE GRADO

Dra. Guadalupe Fabiola Arcos Ortega

Dra. Eliana Paola Acuña Gómez

Dr. Sergio Francisco Flores Ramírez

SUPLENTE

Dr. Fausto Valenzuela Quiñonez

RESUMEN

La centolla (*Lithodes santolla*) constituye uno de los grupos de mayor relevancia entre los crustáceos decápodos que habitan en aguas australes, en donde presenta un alto valor comercial. La pesquería de esta especie en Chile, está centrada en la Región de Magallanes y Antártica Chilena, donde se inició su extracción en 1928 y en la actualidad de acuerdo a las estadísticas registradas por el Instituto de Fomento Pesquera, existe una sobreexplotación del recurso, pero a pesar de ello no ha sido atendida bajo una mirada integral de auto sustentabilidad y la información sobre los diversos procesos genéticos de este organismo es limitada; por tal motivo el gobierno chileno regional ha impulsado la realización de investigaciones dirigidas hacia la generación de conocimiento sobre el estado biológico-pesquero y genético y está fomentando las iniciativas de cultivo en la Región de Magallanes y Antártica Chilena. Con el fin de aportar conocimiento genético de esta especie, en este estudio se planteó como objetivo principal evaluar y analizar la variación y estructura genética de la centolla en toda la Región de Magallanes y Antártica Chilena, mediante marcadores mitocondriales específicos, para lo cual se realizó una secuenciación de nueva generación (NGS, por sus siglas en inglés) de *L. santolla* mediante un secuenciador Illumina HiSeq, utilizando muestras de músculo de 10 machos y 10 hembras, seguida de un análisis bioinformático del genoma mitocondrial completo para diseñar primers para 9 genes mitocondriales (12S, 16S, 18S, COI, COII, COIII, NADH-1, NADH-3 y Región Control). Se colectaron organismos de centolla en toda el área de la Región de Magallanes y Antártica Chilena, mediante una embarcación artesanal centollera bajo un track de investigación y como parte de la planeación para realizar este estudio, la región se dividió en doce zonas de Norte a Sur. Los parámetros estimados para evaluar los niveles de variación genética fueron: número de haplotipos (h), diversidad haplotípica (H) y diversidad nucleotídica (π). La estructura genética se determinó mediante el cálculo de los índices de fijación

F_{st} de Wright y el análisis de varianza molecular (AMOVA). Para estimar el aislamiento por distancia se utilizó la prueba de Mantel. Los resultados indicaron que la diversidad genética medida mediante los genes mitocondriales se encontró dentro del rango observado para otras especies de crustáceos decápodos, presentando valores altos. Los análisis de estructuración poblacional revelaron que no existe diferenciación genética y no se encontró una estructura de aislamiento por distancia; Sin embargo, la alta diversidad genética contenida en algunas de las zonas del Norte y del Sur de la Región de Magallanes y Antártica Chilena, convierte estas regiones en lugares potenciales para la conservación y diseño de futuros planes de manejo genético para la especie.

Palabras clave: *Lithodes santolla*, diversidad genética, estructura genética, Región de Magallanes y Antártica Chilena

Vo. Bo.



Dra. Guadalupe Fabiola Arcos Ortega

ABSTRACT

The southern king crab (*Lithodes santolla*), (Molina 1782), is one of the most important decapod crustacean found in Antarctic waters, where has the highest commercial importance along these coasts. The fishery of this specie in Chile is centered in the region of Magellan and Chilean Antarctic Region, where extraction began in 1928 and now according to statistics compiled by the Institute of Fisheries Development, there is overexploitation of the resource, but nevertheless has not been addressed under a comprehensive view of self-sustainability and information various genetic processes of this organism is limited; for this reason the regional Chilean government has pushed conducting research aimed at generating knowledge about the biological-fishing and genetic status and is encouraging initiatives cultivation in the region of Magellan and Chilean Antarctic Region. In order to provide genetic knowledge about this specie, this study was proposed as main objective to evaluate and analyze the variation and genetic structure of the spider crab in the entire Magellan and Chilean Antarctic Region, through specific mitochondrial markers, for which it was made Next Generation Sequencing (NGS) of *L. santolla* by a sequencer Illumina HiSeq, muscle samples using 10 males and 10 females, followed by a bioinformatic analysis of the complete mitochondrial genome to design primers for 9 mitochondrial genes (12S, 16S, 18S, COI, COII, COIII, NADH-1, NADH-3 and Region Control). Organisms of *L. santolla*, were sampled over the entire area of the Magellan and Chilean Antarctic Region, by a craft under investigation. For this study, the region was divided into twelve zones from north to south. Estimates to assess levels of genetic variation parameters were: number of haplotypes (h), haplotype diversity (H) and nucleotide diversity (π). Genetic structure was determined by calculating *Fst* Wright and analysis of molecular variance (AMOVA). Mantel test was used to estimate the isolation by distance. The results indicated that the genetic diversity measured by

mitochondrial genes was within the range observed for other species of decapod crustaceans, presenting high values. The population structure analysis revealed no genetic differentiation and not a structure of isolation by distance was found; however, the high genetic diversity contained in some of the areas of the North and South of the region of Magellan and Chilean Antarctic Region, converts these regions into potential sites for conservation and design of future genetic management plans for the species.

Key words: *Lithodes santolla*, genetic diversity, genetic structure, Magellan and Chilean Antarctic Region.

Vo. Bo.



Dra. Guadalupe Fabiola Arcos Ortega

DEDICATORIA

A Dios por siempre estar presente en mi vida de muchas formas.

Con mucho amor y cariño para mis padres, hermano y cuñada gracias por ser el motor de mi vida por nunca dejarme sola y por alentarme siempre que lo necesite, porque es imposible pagar todo lo que he recibido de ustedes. A mi nueva familia Jesús Espinoza y la mayor bendición del cielo nuestro bebé, por ser esa nueva esperanza que me alienta y llena de fuerza para seguir adelante los amo.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada no. 301983 para la realización de mis estudios de maestría.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste por recibirme en sus instalaciones, especialmente a su personal administrativo, docente y técnico, por todo el apoyo brindado durante el curso de mis estudios.

Al Centro Científico Regional Fundación CEQUA, con un enorme y especial agradecimiento a su directora, la Dra. Eliana Paola Acuña Gómez por todo el apoyo brindado durante el desarrollo de mi tesis y por su gran hospitalidad durante mi estancia en este centro científico y por mantenerse siempre preocupada por el avance de sus estudiantes a pesar de la distancia.

A los proyectos que financiaron el desarrollo de este trabajo: “Estudio combinado de variabilidad genética y morfológica de la centolla (*Lithodes santolla*) en la Región de Magallanes y Antártica Chilena: Herramientas para el manejo, sustentabilidad y plusvalía comercial del recurso” código 12BPC2-13541 y “Desarrollo, transferencia y aplicación de las tecnologías genómicas al desarrollo sustentable del recurso centolla de la Región de Magallanes y Antártica Chilena”. Fondo de innovación para la competitividad FIC-2012 CODIGO BIP: 30127734.

Un agradecimiento muy especial a mi Directora de tesis, la Dra. Guadalupe Fabiola Arcos Ortega en primer lugar por aceptarme como su estudiante, por estar pendiente de mi formación pero sobre todo muchas gracias por no desistir y por esforzarse tanto para la elaboración de esta investigación, por sus desvelos, esfuerzos, paciencia y por compartir sus conocimientos conmigo. Gracias porque a pesar de todo siguió pendiente de mí hasta lograr este objetivo mil gracias por todo. Gracias por enseñarme que siempre que uno quiera conseguir las cosas se pueden lograr.

Al Dr. Sergio Francisco Flores Ramírez por su apoyo, paciencia y orientación por compartir sus conocimientos y por el gran esfuerzo de siempre ayudarme y de estar pendiente de mí. Mil gracias. Al Dr. Martín Ramírez por las facilidades y el apoyo prestado en su laboratorio para el desarrollo de mi trabajo.

Al personal de CEQUA por la ayuda prestada durante mi estancia en la realización de muestreo. Además agradecer a Diana, Karla, Marcos, Manuel, Oscar, por su hospitalidad, amistad y compañerismo. De igual forma quisiera agradecer a Gabriel Orlando Quilahuilque Márquez por su apoyo en la edición de imágenes y por estar siempre alentándome para seguir adelante y confiar en mis capacidades, por ser ejemplo de un gran ser humano, muchas gracias por todo.

Agradezco también a Edwin Velázquez y a la Dra. Rosa María Morelos por su ayuda y consejos durante el desarrollo de la parte molecular de este trabajo. De igual manera agradezco la asesoría de Jesús Armando Medina Espinoza gracias por compartir tus conocimientos conmigo.

A mis compañeros de generación por los buenos momentos compartidos y por el apoyo brindado en el trascurso de la maestría. De manera especial agradezco a mi compañero y amigo René Serrano por todo el apoyo brindado hacia mi trabajo y formación por compartir sus conocimientos conmigo y por ayudarme siempre que lo requerí gracias.

A mis padres, hermano y cuñada, porque sin su ayuda nada de esto sería posible, por apoyar mis decisiones y por ayudarme siempre a salir adelante. A Jesús Espinoza Sánchez y a nuestro pedacito de cielo, por ser el pilar de mi vida y por alentarme a ser mejor cada día, gracias por confiar totalmente en mí por ser un gran esposo y amigo y por estar siempre que te necesito gracias inmensas te amo. A la mi amiga María del Rosario Enciso Pérez por su apoyo, ayuda, comprensión y amistad durante estos años gracias por tus palabras y por preocuparte siempre por mí.

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	i
ABSTRACT	iii
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTOS	vi
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABLAS	xiii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. <i>Lithodes santolla</i>	3
2.1.2. Características biológicas principales.....	3
2.1.3. Reproducción.	6
2.1.4. Distribución.....	7
2.1.5. Hábitat.	9
2.1.6. Pesquería de <i>L. santolla</i> en Chile.....	12
2.2. Administración pesquera de <i>L. santolla</i> en Chile.	17
2.2.1. Situación actual del recurso <i>L. santolla</i> en Chile.	18
2.3. Aplicación de la genética en el manejo pesquero.	19
2.4. Variación genética poblacional.	21
2.5. Estructura genética poblacional en pesquerías.	24
2.6 Stock pesquero.....	25
2.7. Marcadores moleculares.....	26
2.8. Estudios genéticos en Lithodidos.....	28
3. JUSTIFICACIÓN	31

4. HIPÓTESIS.....	32
5. OBJETIVOS.....	32
5.1. Objetivo general.....	32
5.2. Objetivos específicos.....	32
6. MATERIALES Y MÉTODOS	33
6.1. Obtención de organismos.....	33
6.2. Toma de muestras.....	37
6.3. Extracción de ADN.....	37
6.4. Amplificación de ADN mitocondrial.....	38
6.5. Análisis de secuencias de fragmentos de genes mitocondriales.....	41
6.6. Obtención de parámetros genéticos poblacionales.....	41
6.6.1. Variación genética.....	41
6.6.2. Estructura genética.....	42
7.RESULTADOS	43
7.1. Obtención de organismos.....	43
7.2. Extracción de ADN de músculo de <i>L. santolla</i>	43
7.3. Amplificación de fragmentos genes mitocondriales.....	44
7.4. Verificación de la identidad de secuencias de genes mitocondriales.....	44
7.5. Obtención de parámetros genéticos.....	46
7.5.1. Variación genética.....	46
7.5.2. Estructura genética.....	50
7.5.2.1. Índice de fijación ϕ_{st}	50
7.5.2.2. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA).....	57
7.5.2.3. Prueba de Mantel.....	58
8. DISCUSIÓN	59
9. CONCLUSIONES	75

10. PERSPECTIVAS	77
11. LITERATURA CITADA.....	78
12. ANEXOS	90

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** *L. santolla* (Molina, 1782). Fuente: Foto tomada por Manuel Sánchez y editada por Gabriel Orlando Quilahuilque Márquez, Centro Científico Regional, Fundación CEQUA..... 5
- Figura 2.** Vista dorsal y ventral de un macho (izquierda) y de una hembra (derecha) de centolla (*L. santolla*). Fuente: Fotos tomadas por Manuel Sánchez y editadas por Gabriel Orlando Quilahuilque Márquez, Centro Científico Regional, Fundación CEQUA..... 5
- Figura 3.** Ciclo reproductivo de la centolla (*L. santolla*). Fuente: Modificado de: Boschi *et al.*, 1984; Campodónico, 1971; McLaughlin *et al.*, 2004. Editada por Gabriel Orlando Quilahuilque Márquez, Centro Científico Regional, Fundación CEQUA. 6
- Figura 4.** Distribución geográfica de *L. santolla* (sombreado en naranja). Fuente: Vinuesa, 1991. Modificado de www.googleearth. 8
- Figura 5.** Circulación oceánica superficial moderna en el Pacífico Sudeste según Strub *et al.* (1998), con valores de temperatura marina superficial (TSS) (Ocean Atlas Mundial de 2009); PCC: Corriente Perú-Chile, ACC: Corriente Circumpolar Antártica, CHC: corriente de Cabo de Hornos. Localización de los principales frentes del Océano Austral según Orsi *et al.*, (1995); STF = Frente Subtropical (rojo), SAF = Frente subantártico (azul). (b) Salinidad superficial del mar anual (barra de color) frente al sur de América del Sur (World Ocean Atlas, 2009). Extensión de los campos de hielo de la Patagonia modernas y la máxima extensión del PIS durante el LGM (basados en Hollin y Schilling, 1981; McCulloch *et al.*, 2000) se muestra en gris oscuro y azul claro, respectivamente. Fuente: Caniupan *et al.* (2011)..... 10
- Figura 6.** Modelo esquemático de la circulación vertical en las tres zonas de los fiordos australes: a) boca del Guafo a estuario Reloncaví; b) boca del Guafo a estero Elefantes; c) golfo de Penas a canal Concepción; d) estrecho de Magallanes. AE: Agua estuarina. ASAA: Agua Subantártica. ASAAM: Agua Subantártica Modificada. AAESS: Agua Ecuatorial Subsuperficial. Fuente: Sievers y Silva, 2006..... 11
- Figura 7.** Embarcaciones pesqueras de *L. santolla* entre los años 2000-2011. Fuente: Secretaría de Subpesca, 2009..... 13

Figura 8. Desembarque de <i>L. santolla</i> entre los años 1953 a 2013. Fuente: Subsecretaría de Pesca y Acuicultura, 2014.	14
Figura 9. Principales puertos de desembarque de <i>L. santolla</i> en la Región de Magallanes y Antártica Chilena Fuente: Instituto de Fomento Pesquero (IFOP), 2014.	15
Figura 10. Desembarques de los recursos pesqueros de la Región de Magallanes y Antártica Chilena. Fuente: Instituto de Fomento Pesquero (IFOP), 2014.	16
Figura 11. Puntos (sitios) y zonas de muestreo de centolla <i>L. santolla</i> , en el área de estudio de la Región de Magallanes y Antártica Chilena. Fuente: Realizado por Carlos Olave y editado por Gabriel Orlando Quilahuilque Márquez, Centro Científico Regional, Fundación CEQUA.....	34
Figura 12. Corte de caparazón de un pleópodo de <i>L. santolla</i> para la toma de muestra de músculo. Foto tomada por Manuel Sánchez, Centro Científico Regional, Fundación CEQUA.....	37
Figura 13. Matriz pareada con valores del índice de fijación ϕ_{st} (análogo al índice de fijación F_{st}) obtenidos del análisis de secuencias concatenadas de 4 genes mitocondriales de <i>L. santolla</i> (COI I, COI II, 16S y Región control). En los ejes X y Y se presentan las zonas y en el eje Z se presentan los valores del índice de fijación (ϕ_{st}). Fuente: ARLEQUIN V3.5.1.2 (Excoffier y Lischer, 2010).	56
Figura 14. Prueba de Mantel de <i>L. santolla</i> . En el eje X se encuentran las distancias geográficas y en el eje Y las distancias genéticas entre los organismos de las 11 zonas de muestreo de la Región de Magallanes y Antártica Chilena. Se muestra también la línea de tendencia y el valor de R^2	58
Figura 15. Comparativo de relación filogenética de cinco especies de crustáceos y la centolla (<i>L. santolla</i>), en base a las secuencias codificantes del genoma mitocondrial (mtCDS) de cada especie.....	62

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Clasificación taxonómica de la centolla <i>L. santolla</i>	4
Tabla II. Localización geográfica de los sitios de muestreo, número de zona a la que pertenecen y número de muestras de <i>L. santolla</i> obtenidas en cada localidad de la Región de Magallanes y Antártica Chilena.....	36
Tabla III. Iniciadores o Primers diseñados para la amplificación por PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa) de fragmentos de genes de ADN mitocondrial de la centolla (<i>L. santolla</i>).....	39
Tabla IV. Número de muestras de <i>L. santolla</i> amplificadas por PCR punto final y porcentaje de éxito en la secuenciación de fragmentos de genes mitocondriales.	43
Tabla V. Porcentaje (%) de identidad de las secuencias de ADN de <i>Lithodes santolla</i> obtenidas de cada uno de los fragmentos de genes mitocondriales.	45
Tabla VI. Índices de variación genética (diversidad haplotípica (Hd) y diversidad nucleotídica (π) obtenidos en la centolla <i>L. santolla</i> con los fragmentos de los genes mitocondriales COI I, 16S, 12S, región control y COI II, en las 11 zonas de muestreo de la Región de Magallanes y Antártica Chilena.....	48
Tabla VII. Índices de variación genética (diversidad haplotípica (Hd) y diversidad nucleotídica (π) obtenidos en la centolla <i>L. santolla</i> con los fragmentos de los genes mitocondriales COI III, NADH-1, NADH-3 y 18S, en las 11 zonas de muestreo de la Región de Magallanes y Antártica Chilena.....	49
Tabla VIII. Índice de fijación ϕ_{st} (Weir y Cockerham, 1984), para el fragmento del gen COI I de <i>L. santolla</i> en las 11 zonas de muestreo de la Región de Magallanes y Antártica chilena. Arriba de la diagonal valores de significancia y bajo la diagonal valores de ϕ_{st}	51
Tabla IX. Índice de fijación ϕ_{st} (Weir y Cockerham, 1984), para el fragmento del gen 16S y 12S de <i>L. santolla</i> en las 11 zonas de muestreo de la región de Magallanes y Antártica chilena. Arriba de la diagonal valores de significancia y bajo la diagonal valores de ϕ_{st}	52
Tabla X. Índice de fijación ϕ_{st} (Weir y Cockerham, 1984), para el fragmento del gen Región control y COI II de <i>L. santolla</i> en las 11 zonas de muestreo de la Región de Magallanes y Antártica Chilena. Arriba de la diagonal valores de significancia y bajo la diagonal valores de ϕ_{st} . Arriba de la diagonal valores de significancia y bajo la diagonal valores de ϕ_{st}	53
Tabla XI. Índice de fijación ϕ_{st} (Weir y Cockerham, 1984), para el fragmento del gen COI III y 18S de <i>L. santolla</i> en las 11 zonas de muestreo de la Región de	

Magallanes y Antártica Chilena. Arriba de la diagonal valores de significancia y bajo la diagonal valores de ϕ_{st} 54

Tabla XII. Índice de fijación ϕ_{st} (Weir y Cockerham, 1984), para el fragmento del gen NADH-1 y NADH-3 de *L. santolla* en las 11 zonas de muestreo de la Región de Magallanes y Antártica chilena. Arriba de la diagonal valores de significancia y bajo la diagonal valores de ϕ_{st} 55

Tabla XIII. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) utilizando las secuencias concatenadas de los 4 genes mitocondriales de *L. santolla* (COI I, COI II, 16S y Región control) de las 11 zonas de la Región de Magallanes y Antártica Chilena.57

1. INTRODUCCIÓN

El crustáceo decápodo conocido como centolla (*Lithodes santolla*, Molina 1782), es el principal recurso pesquero emblemático de la XII Región de Magallanes y Antártica Chilena, y es una especie de alto impacto en el mercado internacional. Se distribuye principalmente en el Océano Pacífico, desde aproximadamente los 38° de Latitud Sur, desde la X hasta la XII región de Chile, abarcando desde la Isla Grande de Chiloé (Lat. 42°40'36" S, Long. 73°59'36" O) hasta Cabo de Hornos (Lat. 55°58'48.5" S, Long. 67°17'21" O), incluyendo el estrecho de Magallanes. Actualmente la pesquería de centolla representa una de las actividades pesqueras más rentables y de mayor valor económico de la XII región al ser considerado un crustáceo marino de carnes muy apreciadas en la gastronomía fina, lo cual lo convierte en un producto generador de altas divisas para el país por su exportación a varios países (IFOP, 2014). En la Región de Magallanes y Antártica Chilena se han propuesto medidas de manejo para contribuir a conservar este recurso y evitar el deterioro o colapso de la pesquería, como el que ocurrió con la centolla del canal de Beagle, Tierra de Fuego Argentina (Lovrich, 1997). Dentro de las implementaciones de regulación que se han establecido, se encuentran el tamaño mínimo de comercialización, el cual es de 120 mm de longitud de caparazón, la veda permanente de hembras del crustáceo y vedas temporales implementadas en zonas donde se observa un bajo rendimiento del recurso (Sernapesca, 1997; IFOP, 2014).

Para realizar actividades de pesca con un manejo sustentable, es necesario conocer aspectos biológicos y poblacionales de la especie a extraer (estructura, tasa de mortalidad, patrón reproductivo y características genéticas poblacionales, entre otros aspectos); sin embargo, en ocasiones se realizan actividades pesqueras sin conocimiento de estos aspectos de la especie a explotar y además frecuentemente se desconocen cuantas unidades genéticas existen en el área de explotación o distribución de los recursos pesqueros (Beaumont y Hoare, 2003; Ungfors *et al.*, 2009). En este sentido la genética tiene una aplicación importante

en el manejo de las pesquerías (Beaumont y Hoare, 2003; Ungfors *et al.*, 2009; Mustafa, 1999). La genética utiliza diversos marcadores moleculares para evaluar los recursos pesqueros, los cuales son eficientes en la definición de unidades genéticas (stocks pesqueros), ayudando a determinar el flujo genético (intercambio de genes) entre individuos de zonas cercanas o alejadas; además de estimar la variación genética existente dentro y entre las poblaciones (Carvalho y Pitcher, 1994; Mustafa, 1999).

Dentro de los marcadores más utilizados para conocer la diversidad genética se encuentra el ADN mitocondrial (ADNmt) (Avice, 1994), el cual es una molécula circular de herencia materna de carácter haploide y es una herramienta útil en el estudio de estructuración poblacional y estudios taxonómicos de diferentes especies acuáticas, debido a que tiene una alta tasa de evolución, y es sensible a fenómenos poblacionales (cuellos de botella o hibridaciones) (Moritz *et al.*, 1987).

El conocimiento sobre la diversidad y la estructura genética mediante marcadores moleculares ha sido una herramienta indispensable para el manejo en las pesquerías de especies marinas comerciales (Mustafa, 1999); sin embargo, para la centolla (*L. santolla*) existe limitada información genética poblacional disponible, por lo cual en el presente estudio se estimó y analizó la variación y estructura genética de la centolla en la Región de Magallanes y Antártica Chilena, mediante marcadores moleculares de tipo mitocondrial.

2. ANTECEDENTES

2.1. *Lithodes santolla*.

2.1.2. Características biológicas principales.

La centolla o *Lithodes santolla* (Molina, 1782), es un crustáceo decápodo bentónico de aguas templado-frías perteneciente a la familia Lithodidae (Tabla I). Su morfología se caracteriza principalmente por la presencia de un caparazón triangular a pentagonal, con numerosas espinas de tamaño similar (Fig. 1), mientras el resto de la superficie es liso (Vinuesa *et al.*, 1990). Puede alcanzar una longitud de caparazón (LC) de hasta 19.8 cm y un peso superior a los 7 kg (Vinuesa, 1984; 2000). Se estima que puede llegar a vivir un promedio de 14 a 20 años aproximadamente (Vinuesa, 1984; 2000). El apareamiento se lleva a cabo una vez al año, durante la muda de las hembras. Al alcanzar la madurez sexual las hembras mudan cada año, con mayor intensidad en diciembre, mientras que los machos lo hacen 2 ó 3 veces al año después del periodo de apareamiento (Vinuesa, 2000). Las mudas se producen en distintas épocas del año, en los machos a principios del otoño o invierno y en las hembras al fin de la primavera o principios del verano, sin embargo existen variaciones entre los organismos de las distintas localidades donde han sido estudiadas (Vinuesa, 1985).

Presentan un dimorfismo sexual bien marcado, que se aprecia por su diferencia de tamaño y peso. Entre las características sexuales primarias se hallan la presencia de apéndices abdominales (pleópodos) y el abdomen semicircular, asimétrico y bien expandido de las hembras, que llega a cubrir parcialmente la base de las patas caminadoras, en cuanto a los machos su abdomen es triangular y simétrico, el cual carece de apéndices (Fig. 2). La especie se caracteriza principalmente por presentar un carácter alimenticio oportunista, predador y carroñero (Vinuesa, 1987). Dentro de los animales que consumen se encuentra la langostilla o bogavante, *Munida subrugos*, además de un pez óseo (no identificado), algunos equinodermos algas y otros invertebrados (Vinuesa, 1987).

Tabla I. Clasificación taxonómica de la centolla *L. santolla*.

Reyno	Animalia
Phylum	Arthropóda
Subphylum	Crustácea
Clase	Malacostraca (Latreille, 1802)
Subclase	Eumalacostraca (Grobben, 1892)
Superorden	Eucarida (Calman, 1904)
Orden	Decápoda (Latreille, 1802)
Suborden	Pleocyemata (Burkenroad, 1963)
Infraorden	Anomura
Superfamilia	Paguroidea
Familia	Lithodidae
Subfamilia	Lithodinae (Ortmann, 1901)
Género	<i>Lithodes</i>
Especie	<i>Lithodes santolla</i> (Molina, 1782)



Figura 1. *L. santolla* (Molina, 1782). Fuente: Foto tomada por Manuel Sánchez y editada por Gabriel Orlando Quilahuilque Márquez, Centro Científico Regional, Fundación CEQUA.



Figura 2. Vista dorsal y ventral de un macho (izquierda) y de una hembra (derecha) de centolla (*L. santolla*). Fuente: Fotos tomadas por Manuel Sánchez y editadas por Gabriel Orlando Quilahuilque Márquez, Centro Científico Regional, Fundación CEQUA.

2.1.3. Reproducción.

L. santolla se reproduce anualmente, entre los meses de noviembre y enero, en todo el rango de su distribución. La primera madurez sexual es un dato de mucha utilidad para saber a partir de qué tamaño se pueden comenzar a extraer de la población a aquellos animales que se pretenden comercializar, se estima que la madurez sexual se alcanza aproximadamente a partir de los 5 ó 6 años de edad. La reproducción se da una vez al año al desovar las hembras, las cuales portan normalmente, entre 5400 y 30000 huevos o embriones, dependiendo del tamaño, los que son incubados entre 9 y 10 meses, hasta nacer como larvas “zoea” (Fig. 3), (Vinuesa, 1987).

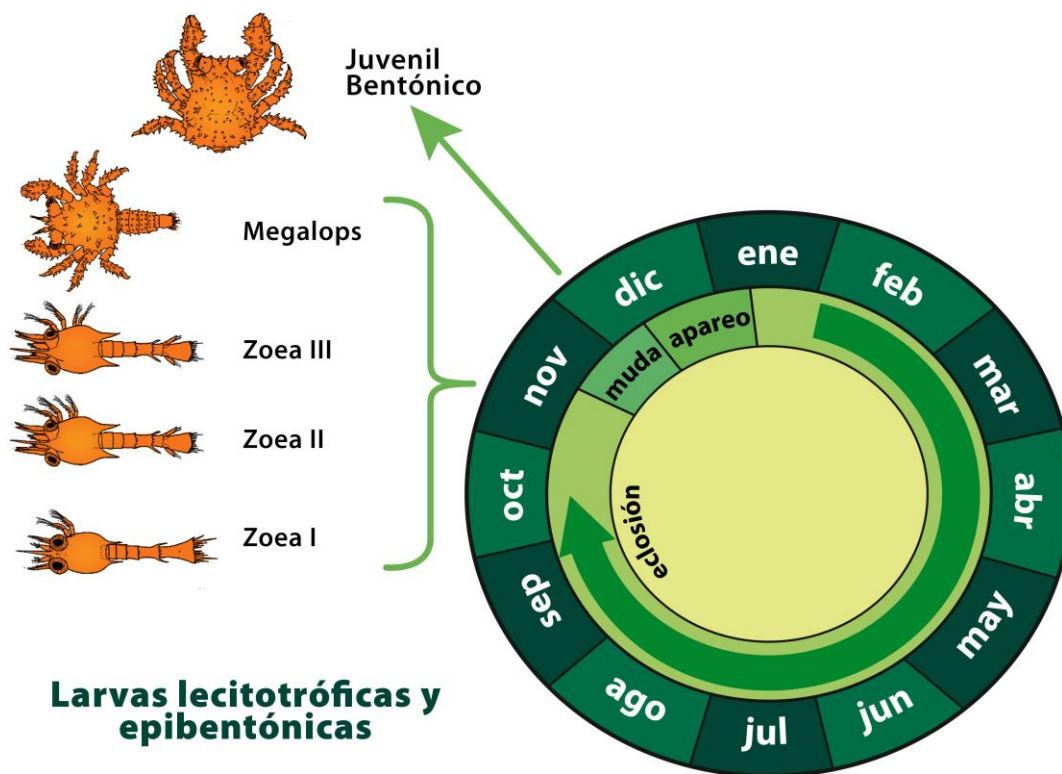


Figura 3. Ciclo reproductivo de la centolla (*L. santolla*). Fuente: Modificado de: Boschi *et al.*, 1984; Campodónico, 1971; McLaughlin *et al.*, 2004. Editada por Gabriel Orlando Quilahuilque Márquez, Centro Científico Regional, Fundación CEQUA.

La especie, como todos los crustáceos superiores, nace en forma de larva, menos nadadora y más grande que muchas otras especies similares (aproximadamente 4 mm de longitud total), denominada “zoea”. Existen tres estadios de “zoea”, donde la larva va creciendo en tamaño y desarrollando más sus apéndices hasta arribar a un estadio de post-larva (duración aproximada de unos 20 a 25 días), con una morfología intermedia entre “larva” y “centollita” (Fig. 3), (Vinuesa, 1985). Durante el primer año como juvenil, muda 6-7 veces; en el segundo año 4-5 veces y en el tercer año unas 3 veces. Al finalizar este tercer año la centolla mide aproximadamente 35-50 mm de LC (Vinuesa, 1989). A partir de aquí, comienza la etapa de pubertad y con ella, la maduración de sus órganos genitales. Este hecho produce una gran diferencia en el crecimiento y a partir del tercer año los machos continúan mudando 2 o 3 veces/año, pero las hembras comienzan a mudar una única vez por año hasta su muerte, que puede ocurrir 20 años más tarde o aún más (Vinuesa y Lombardo, 1982).

2.1.4. Distribución.

Se distribuye principalmente en el Océano Pacífico, desde aproximadamente los 38° de Latitud Sur, desde la X hasta la XII región de Chile, abarcando desde la Isla Grande de Chiloé (Lat. 42°40'36" S, Long. 73°59'36" O) hasta Cabo de Hornos (Lat. 55°58'48.5" S Long. 67°17'21" O), incluyendo el estrecho de Magallanes y Canal del Beagle (Vinuesa, 1991; Guzmán *et al.*, 2004) (Fig. 4). Por el Océano Atlántico se localiza, en el sector sur de la Isla Grande de Tierra del Fuego. En la Patagonia, se encuentra en el Golfo San Jorge por aguas profundas hasta la altura de Uruguay. En las costas de Tierra del Fuego y sur de Chubut (Golfo San Jorge) se localiza en fondos costeros hasta aproximadamente los 90 metros de profundidad y más al norte se encuentra a profundidades superiores a 150-200 metros, en aguas influenciadas por la corriente de las Islas Malvinas (Vinuesa, 1977). También se distribuye en la zona submareal en profundidades de hasta 700 metros, en donde por lo general habita en fondos de arena y piedras (Vinuesa, 1977).

Los adultos de *L. santolla* realizan migraciones en épocas reproductivas a aguas entre los 30 y 120 metros, razón por la cual la captura de adultos en esta época se ve beneficiada. Sin embargo, también se cree que los individuos no realizan migraciones de largas distancias y que el recurso en la región, se encuentra constituido por varias unidades poblacionales con bajo grado de interacción entre ellas (Boschi *et al.*, 1992; Subsecretaría de Pesca y Acuicultura, 2009).



Figura 4. Distribución geográfica de *L. santolla* (sombreado en naranja). Fuente: Vinuesa, 1991. Modificado de [www.googleearth](http://www.googleearth.com).

2.1.5. Hábitat.

El hábitat de la centolla, *L. santolla*, presenta una compleja red de canales, ensenadas y masas de tierra que forman un sistema de cuencas cuyas peculiaridades hidrográficas y ecológicas son aún poco conocidas. Los fiordos en esa región son de tipo estuarino (caudal que ha sido invadido por el mar debido a la influencia de las mareas y al hundimiento de las riberas) generalmente con lados empinados, fondos rocosos (que pueden ser finamente recubiertos con sedimentos) y derrames submarinos (Kennish, 1986), por lo que son considerados valles glaciares recubiertos por mar (Antezana, 1999). Los fiordos están altamente influenciados por los vientos del oeste y del norte del frente polar, asimismo está influenciado por las aguas de las corrientes Circumpolar Antártica y Cabo de Hornos (Fig. 5); además la precipitación, la escorrentía continental y deshiele de glaciares, hacen de estos fiordos un gran ecosistema de aguas salobres. A diferencia de los fiordos de Alaska y Columbia Británica, los fiordos del sur de Chile presentan menos escurrimientos de agua dulce y por lo tanto cuentan con una compleja estructura de temperatura en la columna de agua (Pickard, 1971; 1973). Los fiordos tienen influencia marítima del Océano Atlántico y Pacífico por lo tanto el intercambio de aguas oceánicas y continentales, debido a las mareas es diferente en ambas entradas, occidental y oriental (Panella *et al.*, 1991).

El sistema hidrográfico de la región se caracteriza por un gradiente de temperatura y salinidad, siendo las aguas subantárticas más frías y salinas que las que se encuentran cerca o dentro de los fiordos (Fig. 5) (Antezana, 1999; Caniuopan *et al.*, 2011). Los fiordos chilenos representan un sistema semicerrado de compleja batimetría, lo que constituye un marco ambiental importante para la comprensión de la distribución biológica de los organismos y sus relaciones y adaptaciones (Antezana, 1999).

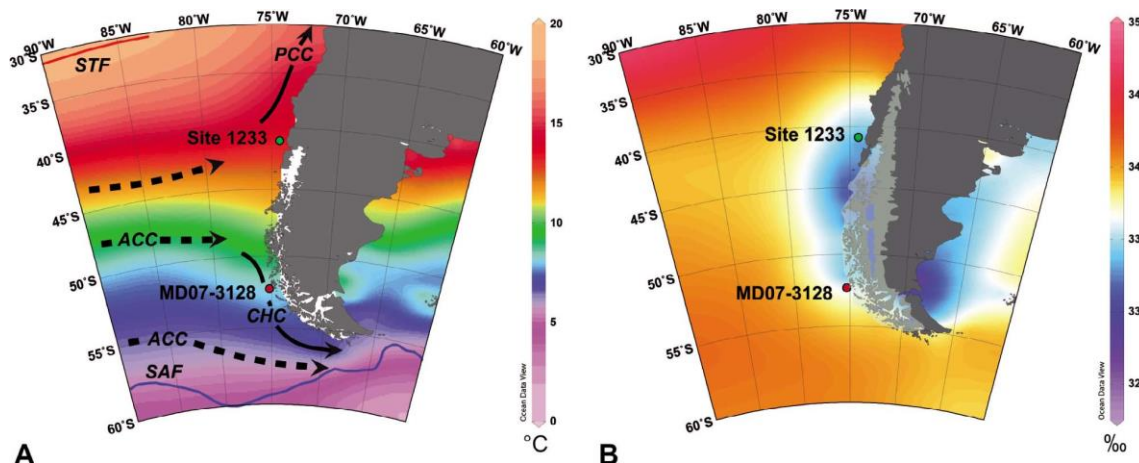


Figura 5. Circulación oceánica superficial moderna en el Pacífico Sudeste según Strub *et al.* (1998), con valores de temperatura marina superficial (TSS) (Ocean Atlas Mundial de 2009); PCC: Corriente Perú-Chile, ACC: Corriente Circumpolar Antártica, CHC: corriente de Cabo de Hornos. Localización de los principales frentes del Océano Austral según Orsi *et al.*, (1995); STF = Frente Subtropical (rojo), SAF = Frente subantártico (azul). (b) Salinidad superficial del mar anual (barra de color) frente al sur de América del Sur (World Ocean Atlas, 2009). Extensión de los campos de hielo de la Patagonia modernas y la máxima extensión del PIS durante el LGM (basados en Hollin y Schilling, 1981; McCulloch *et al.*, 2000) se muestra en gris oscuro y azul claro, respectivamente. Fuente: Caniupan *et al.* (2011).

Con base en la geomorfología de la Región de Magallanes y Antártica Chilena y de acuerdo a sus diferencias en tipo de formas de fondo en los perfiles submarinos y piedmonts, los fiordos chilenos se han dividido en tres zonas (norte, centro y sur) (Fig. 6) (Araya-Vergara, 2006). La Zona Norte, está constituida por sedimentos con estructura laminar (ritmitas), que morfológicamente corresponden a explanadas muy llanas producidas por represamiento de los sedimentos, ocasionalmente están alternadas con morrenas submarinas. La Zona Central, presenta explanadas con capas laminadas horizontales de sedimentos, alternadas con morrenas submarinas, denominadas bancos morrénicos y en la Zona Sur, los fiordos tienen relativamente baja profundidad, siendo generalmente, los menos profundos de toda la zona austral y no poseen bancos morrénicos (Fig. 6).

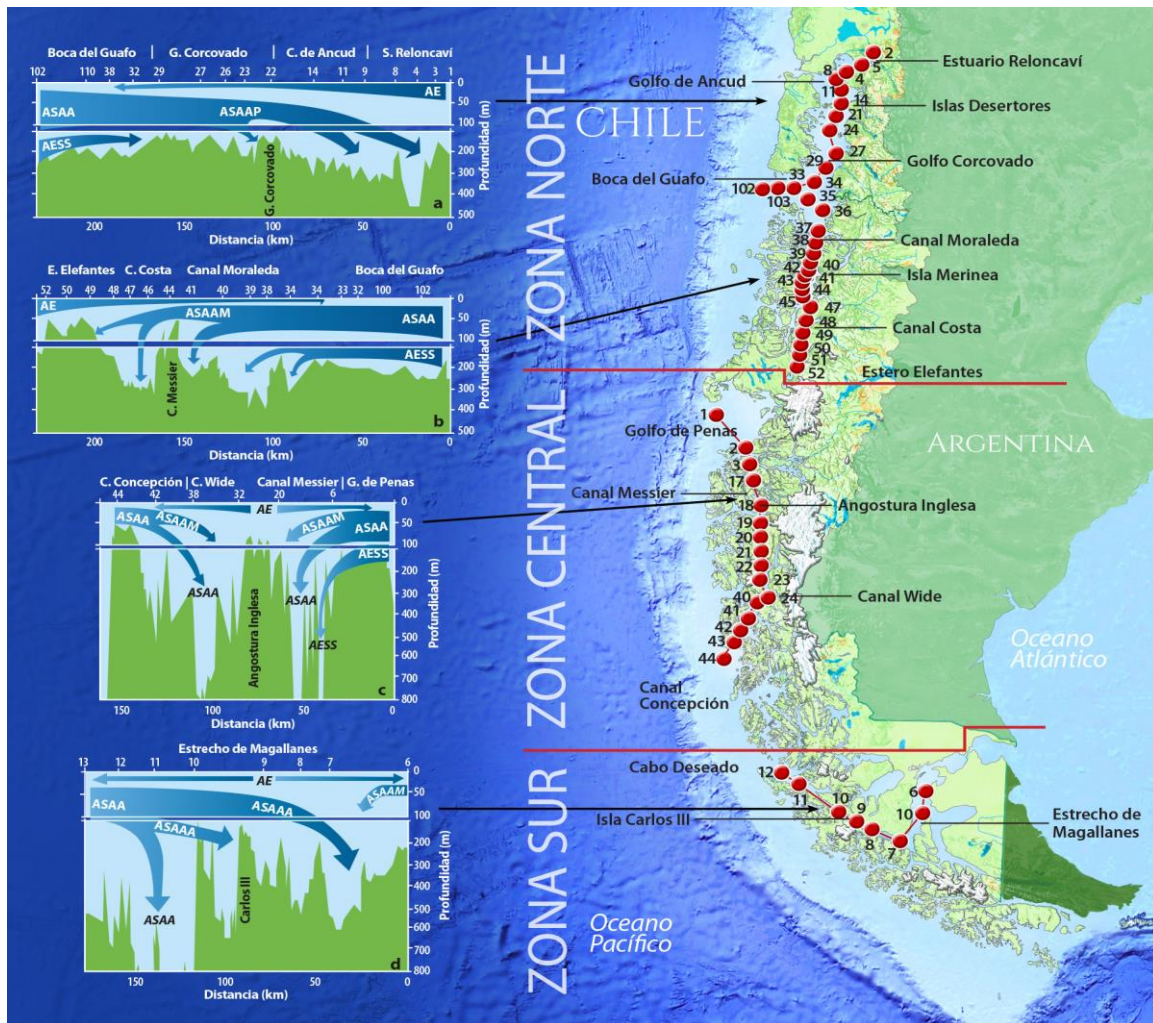


Figura 6. Modelo esquemático de la circulación vertical en las tres zonas de los fiordos australes: a) boca del Guafo a estuario Reloncaví; b) boca del Guafo a estero Elefantes; c) golfo de Penas a canal Concepción; d) estrecho de Magallanes. AE: Agua estuarina. ASAA: Agua Subantártica. ASAAM: Agua Subantártica Modificada. AEES: Agua Ecuatorial Subsupsuperficial. Fuente: Sievers y Silva, 2006.

2.1.6. Pesquería de *L. santolla* en Chile.

Para comprender la situación de la centolla como recurso pesquero es importante conocer históricamente el progreso de la pesquería a lo largo del tiempo (desde sus inicios hasta la actualidad). La pesquería de centolla inicia en los años 30, los registros formalmente datan a partir de 1945 (Díaz, 1987; Cárdenas *et al.*, 1987).

Durante los primeros 30 años los resultados fueron inferiores a 150 toneladas, ya que no se contaba con la infraestructura pesquera adecuada y se trabajaba solo una tercera parte del año, por lo tanto todo el producto se destinaba únicamente al mercado nacional (Cárdenas *et al.*, 1987). Alrededor del año 1973 los desembarques se mantuvieron entre las 200 y 450 toneladas por año (Hernández, 1986; Cárdenas *et al.*, 1987), siendo las principales zonas de pesca las islas al norte de Tierra del Fuego e incorporándose posteriormente Isla Dawson, Seno Almirantazgo, la península de Brunswick y seno Otway, manteniéndose como zonas de explotación hasta 1974 (Guzmán *et al.*, 2004). En 1975 se incorporó la pesca en la región sur. En 1976 alcanza un gran incremento en los desembarques, manteniéndose estable a lo largo de un periodo considerable. Las áreas de extracción se expanden y se inician capturas en el Archipiélago de Cabo de Hornos y en 1979 se incorpora el Estrecho de Magallanes, logrando alcanzar volumen total de 2.265 toneladas (Cárdenas *et al.*, 1987).

En los años 80's se expandió la pesca en regiones al norte del Estrecho Nelson; sin embargo se produce una disminución en el desembarque obteniendo solo 1.280 toneladas, las cuales reflejaron fluctuaciones en el mercado internacional. Por lo tanto en 1982 se abren nuevos sitios de captura localizados al norte del Estrecho de Magallanes tomando como área límite la Isla Guarello (Hernández, 1986). En 1983 se incorporan la pesca en Seno Profundo y Seno Langford, logrando una captura de 2.755 toneladas. En 1984 cuando las actividades de

pesca se concentraron en un área restringida de Seno Año Nuevo, se alcanzó un desembarque de 2.746 toneladas aproximadamente (Cárdenas *et al.*, 1987).

A partir de 1996 la pesquería incrementa progresivamente, mostrando variaciones alrededor de los años 2000 – 2013 presentando valores cercanos a las 3.000 toneladas. Con base en la cifra oficial del Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura en 2013 se desembarcó un total de 4.716 toneladas de Centolla (Fig. 7).

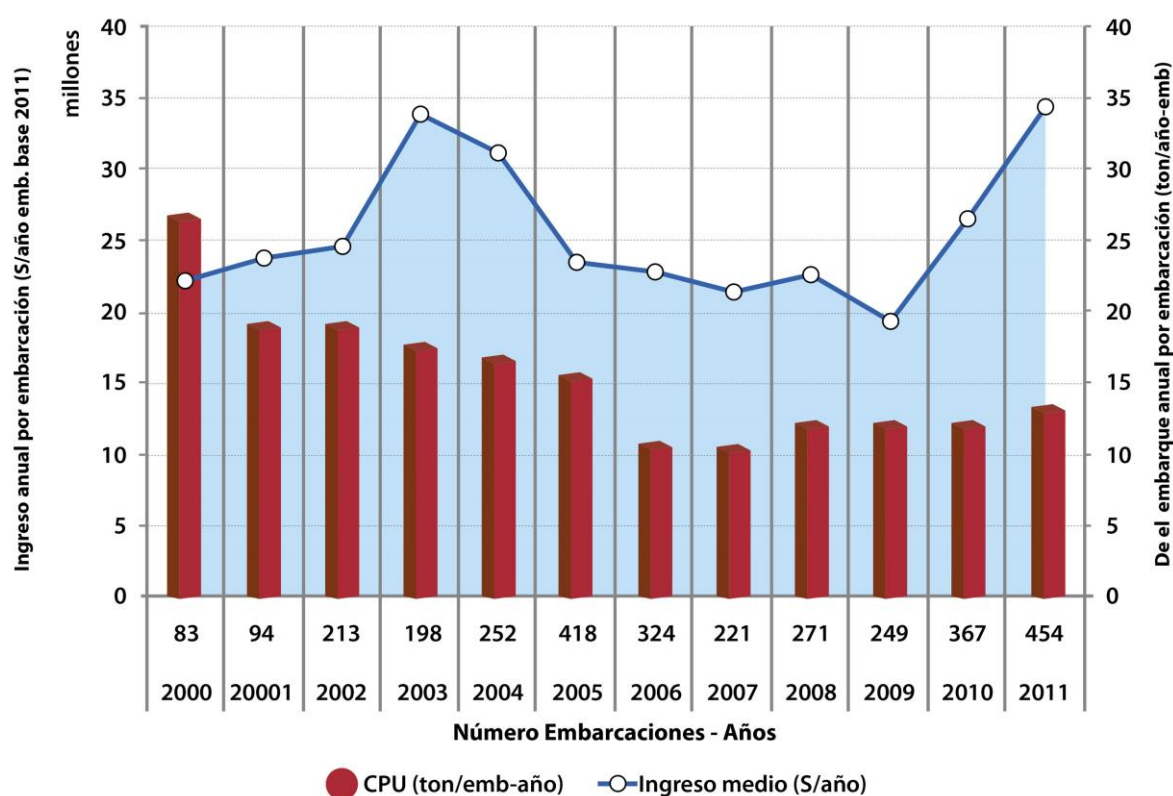


Figura 7. Embarcaciones pesqueras de *L. santolla* entre los años 2000-2011. Fuente: Secretaría de Subpesca, 2009.

En este mismo periodo se dispuso como registró el desembarque de 424 embarcaciones artesanales aproximadamente. En 2014 se registra un total de

2.758 toneladas y alrededor de 359 embarcaciones artesanales operando. Al mismo tiempo se autorizan 674 autorizadas, permitiendo laborar en ellas a cualquier pescador inscrito en la XII Región (Fig. 8). Durante el año 2010 se obtuvo un incremento del 19.4% con respecto a lo registrado en el año anterior, dicho aumento se hizo evidente en el incremento de plantas procesadoras de centolla, teniendo un registro de 17 en el 2009 para alcanzar un total de 30 al siguiente año. Lo anterior trajo consigo el elevado valor de venta en el mercado internacional, a causa del cierre de pesca de Lithodidos en el Hemisferio Norte (Daza *et al.*, 2012).

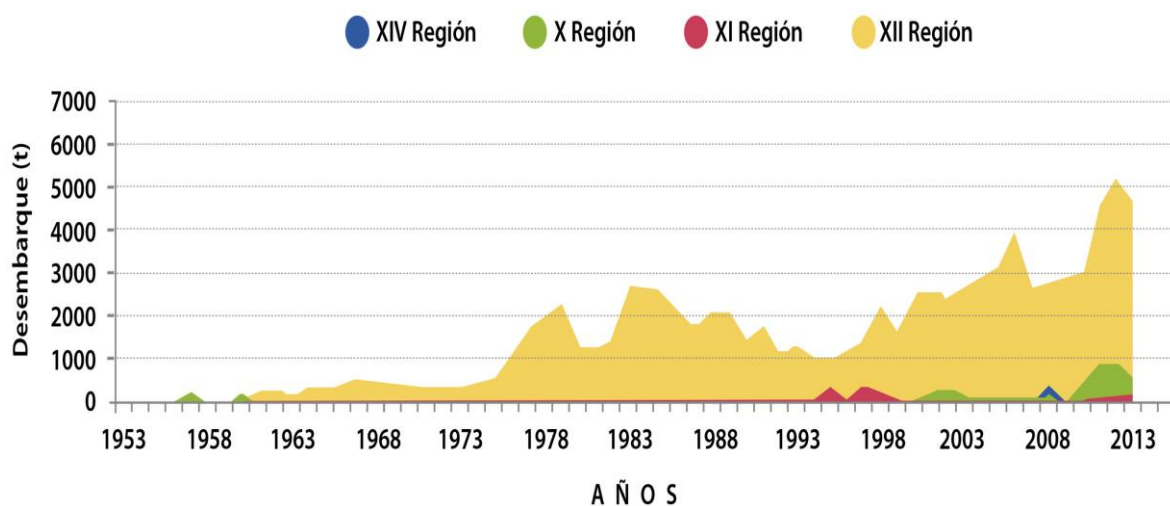


Figura 8. Desembarque de *L. santolla* entre los años 1953 a 2013. Fuente: Subsecretaría de Pesca y Acuicultura, 2014.

Debido a que el precio de exportación del recurso es alto, la centolla posee un gran valor económico en comparación con otros productos pesqueros, logrando así, que la pesca de centolla sea de las actividades más rentables en la Región de Magallanes y Antártica Chilena (Acuña, 2012). Actualmente los principales puertos pesqueros de desembarque de la Región son: Puerto Natales, Punta Arenas, Puerto Porvenir y Puerto Williams (Fig. 9).

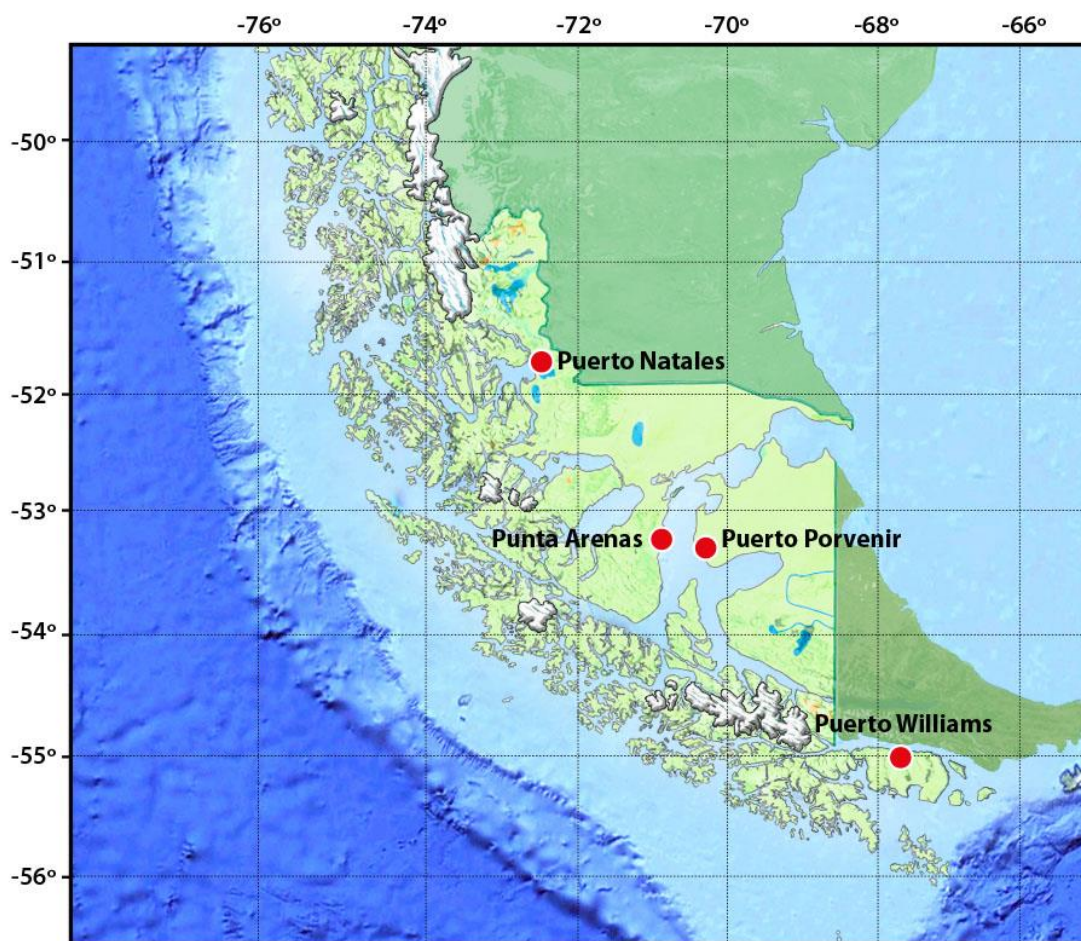


Figura 9. Principales puertos de desembarque de *L. santolla* en la Región de Magallanes y Antártica Chilena Fuente: Instituto de Fomento Pesquero (IFOP), 2014.

La pesca realizada en la Región de Magallanes y Antártica Chilena es de carácter mixto, es decir incluye la pesca de moluscos, equinodermos, peces y crustáceos y es realizada exclusivamente por embarcaciones artesanales mayores a 15 metros de eslora y que usan únicamente trampas dispuestas en el fondo unida por una línea para la captura. La carnada utilizada principalmente son las cabezas de merluza y salmón (Guzmán *et al.*, 2004).

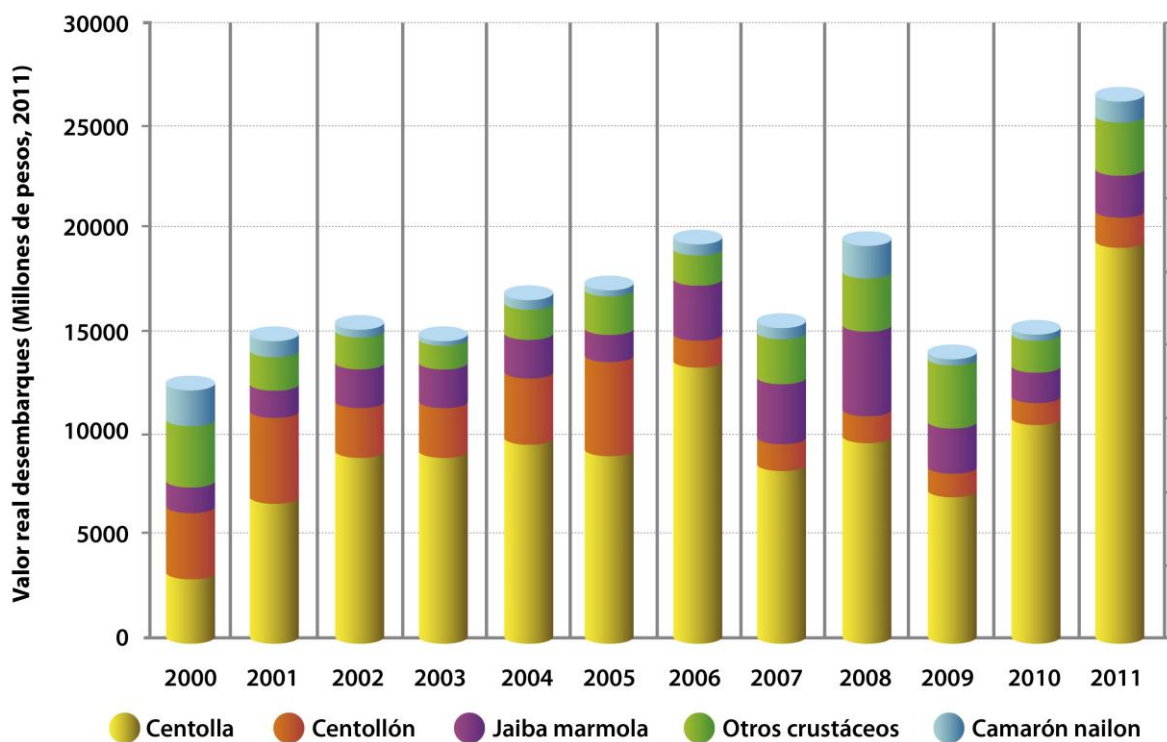


Figura 10. Desembarques de los recursos pesqueros de la Región de Magallanes y Antártica Chilena. Fuente: Instituto de Fomento Pesquero (IFOP), 2014.

La pesca de recursos marinos entre los años 1998 a 2005 en la XII Región de Magallanes y Antártica chilena fue de aproximadamente 334.895 toneladas del cual la centolla representa el 6% sobre el total. En comparación con el desembarque de salmón (especie cultivada desde hace tiempo con un alto valor económico), la centolla representa menores porcentajes. Dentro del grupo de los crustáceos extraídos en la XII región la centolla representa el 38.5% aun en comparación con el caracol *Trophon spp*, el molusco con mayor tonelaje de desembarque dentro de la región (9.300 toneladas), la centolla continua siendo superior. Otra especie que es desembarcada en grandes cantidades es el erizo mostrando más de 170,000 toneladas de las 334.895 desembarcadas, representado el 50,8% de los recursos extraídos en la Región de Magallanes y Antártica Chilena (Fig. 10).

2.2. Administración pesquera de *L. santolla* en Chile.

Actualmente, el recurso es explotado bajo la categoría de plena explotación (Res. Ex. N° 3556/2014) a lo largo de toda la costa desde el archipiélago de Cabo Hornos hasta el sector de Puerto Edén (regiones X, XI, XII y XIV), teniendo como principal puerto de desembarque el de Punta Arenas en la región de Magallanes siendo esta región la que presenta los mayores volúmenes de extracción a nivel nacional; reportándose 4,548.69 toneladas para el año 2013 (Subsecretaría de Pesca y Acuicultura, 2014).

El principal objetivo de las reglamentaciones impuestas a las pesquerías ha sido resguardar el potencial reproductivo, por lo que en la actualidad se administra mediante la estrategia conocida como SSS, (Size, Sex & Season: Tamaño, Sexo & Estación) con regulación de talla, prohibición de desembarque de hembras y veda estacional (que protege el proceso reproductivo). Complementariamente se dispone de regulación del esfuerzo pesquero, lo que se realiza mediante la ordenación de los artes de pesca y la mantención del número actual de embarcaciones, prohibiéndose el ingreso de nuevas unidades de esfuerzo.

Específicamente las regulaciones son: una veda biológica que va del 01 de diciembre al 30 de junio asegurando de esta manera que los individuos puedan reproducirse antes de la temporada extractiva. No se permiten registros de pesca artesanal de la X, XI, XII, XIV, regiones (Res. Ex. N° 3556/2014). Sólo se permite el uso de trampas centolleras para su pesca (Res. Ex. N° 442/1981) ya que ha demostrado ser el arte de pesca menos invasivo tanto para la especie objetivo como para la fauna de fondo. La talla mínima legal para la XII región (TML) es de 11 cm de LC (medidos desde el extremo distal del rostro a la base del caparazón) (D. Ex. N° 375/1987); ya que los individuos comienzan su madurez funcional (tamaño en que el macho puede sujetar a la hembra en la etapa precopulatoria) a partir de los 8-9.5 cm de LC, con esta medida se permite a una fracción de la población reproducirse antes ser pescados. Está prohibida la captura y el desembarque de hembras con la finalidad de asegurar el reclutamiento de nuevos

individuos a las siguientes generaciones (D. Ex. N° 443/1990) (Subsecretaría de Pesca y Acuicultura, 2013; Vinuesa, 2000).

2.2.1. Situación actual del recurso *L. santolla* en Chile.

La gestión y fiscalización de la extracción del recurso centolla tiene grandes dificultades en la Región de Magallanes y Antártica Chilena, debido a la alta dispersión de los caladeros de pesca y la compleja y vasta zona geográfica de los fiordos estuarinos (Fig. 6). Esto facilita a los pescadores capturar ejemplares machos debajo de la talla mínima legal, capturar hembras, usar buceo autónomo, redes y el procesamiento clandestino. Lo que repercute en el deterioro de las poblaciones de centolla en la Región de Magallanes y Antártica Chilena.

La información biológica del recurso se concentró a finales de los años 70's e inicio de los años 80's, abordando preferentemente, aspectos como estructura de tamaño, relación talla-peso, fecundidad, talla de primera madurez sexual, proporción de sexo, captura por unidad de esfuerzo, parasitismo, crecimiento relativo, mortalidad natural, fauna acompañante, desarrollo gonadal, desarrollo larvario, periodo de eclosión de embriones, periodo de transporte de embriones, periodo de muda, copula y migraciones (Daza *et al.*, 2009). Posteriormente en los años 90's y 2000 se han realizado varias inspecciones biológico pesqueras prácticamente con los mismos objetivos que los realizados durante los años 80's (Guzmán *et al.*, 2004; Alarcón *et al.*, 2007).

La accidentada geografía de la Región de Magallanes y Antártica Chilena, las condiciones climáticas, la lejana ubicación del recurso, la inclemencia del tiempo, las rudimentarias artes de pesca (principalmente el tipo de embarcaciones), entre otros, son otros factores que provocan que la faena de pesca resulte costosa (esfuerzo pesquero) y por ende el valor de comercialización de los productos aumente, sumando el costo de transportación para su exportación (Acuña, 2012).

Para evitar la sobreexplotación y el colapso de la pesquería de centolla (*L. santolla*) en la Región de Magallanes y Antártica Chilena, es importante ampliar el

conocimiento sobre su biología reproductiva y sobre su genética poblacional, ya que los análisis genéticos son una herramienta clave para determinar la variabilidad genética, los linajes maternos y ciertos eventos de la historia evolutiva de la especie, y es gracias a este tipo de resultados que se pueden esbozar las líneas base de programas de conservación, manejo y programas de mejoramiento de características productivas en la especie (Mustafa, 1999).

Avanzar en el conocimiento de estos aspectos es de gran utilidad en la administración de la pesquería y en el desarrollo de biotecnologías de cultivo que permitan la conformación de pies de cría y el inicio de programas de mejoramiento genético.

2.3. Aplicación de la genética en el manejo pesquero.

De acuerdo con varias organizaciones internacionales (CITES-UNEP, 2011; IUCN, 2013), un número bastante significativo de recursos pesqueros se encuentran sobreexplotados o colapsados y según la comunidad pesquera los criterios utilizados sobreestiman el riesgo de extinción.

Los recursos pesqueros sujetos a explotación tienen diferentes etapas: desarrollo, totalmente explotadas, sobreexplotadas, colapso y recuperación. Esta última depende de la resiliencia (capacidad de reponerse ante una perturbación) de la población a los factores causales del colapso (Valenzuela-Quiñonez, 2014). Pero actualmente existe un gran número de recursos pesqueros que presentan escasa información para una completa evaluación (Costello *et al.*, 2012) y por lo tanto, la aplicación objetiva de los criterios para determinar el nivel de amenaza de los recursos es limitada.

Esta falta de información para evaluar el estado de un recurso pesquero obliga a realizar evaluaciones indirectas (Lotze *et al.*, 2011). Algunas mediciones indirectas de evaluación de recursos pesqueros son: la estimación de su distribución y

abundancia, estructura de tallas, características demográficas y su diversidad genética (Valenzuela-Quíñonez, 2014).

En este contexto, el establecimiento de estrategias precautorias para el manejo de recursos pesqueros requiere de un mejor entendimiento de la dinámica de la poblaciones, pero para ello es indispensable emplear herramientas o indicadores que permitan conocer la dinámica presente y pasada de los recursos pesqueros.

En la actualidad el empleo de herramientas moleculares permite contar con una perspectiva de los efectos de la sobre explotación a nivel genético en diferentes escalas temporales y permiten inferir si un recurso presenta algunas características de extinción (Valenzuela-Quíñonez, 2014). Estas herramientas combinadas con parámetros demográficos poblacionales (tasa de crecimiento poblacional, edad de primera madurez, coeficiente de crecimiento individual, fecundidad y longevidad) permiten tener un panorama de la dinámica poblacional a corto y largo plazo, así como estimar el grado de peligro de extinción de las especies sometidas a explotación, con pocos datos disponibles (Mustafa, 1999).

Para la mayoría de los recursos pesqueros no se cuenta con información para realizar evaluaciones y/o para determinar el nivel de amenaza en que se encuentran. Por lo que el empleo de marcadores moleculares han contribuido significativamente en la evaluación, ya que existe una relación directa entre los niveles de diversidad genética y el peligro de extinción (Palstra y Ruzzante, 2008).

Los recursos pesqueros pueden presentar diferentes niveles de recuperación después de una perturbación: total recuperación, cuando regresan a su estado inicial (antes de la perturbación), recuperación parcial e irreversible el cual es un estado de daño por un periodo prolongado de tiempo (Lotze *et al.*, 2011) y en este sentido, el uso de las herramientas moleculares también pueden proporcionar señales del nivel de recuperación de un recurso, aun cuando no se cuente con información de base histórica de la población (Mustafa, 1999).

Una meta de la conservación biológica es prevenir la extinción de las poblaciones, por lo que mantener la diversidad genética tenderá a reducir la posibilidad de extinción y permitirá establecer medidas de conservación en el largo plazo (Frankham, 2005; Mustafa, 1999).

La genética de poblaciones estudia el origen, la cantidad, la distribución de la variación genética presente en las poblaciones y los procesos por los cuales estas poblaciones evolucionan, es decir, cómo es el cambio en las frecuencias alélicas a través de las generaciones (Templeton, 2006).

2.4. Variación genética poblacional.

La variabilidad genética es una característica importante de las poblaciones y especies, por lo que la cantidad y distribución espacio-temporal de la variación genética de una población o especie determinan su permanencia en el tiempo (es decir, su destino evolutivo), ya que la cantidad (los niveles) de variabilidad genética es el sustrato que les permite responder a condiciones ambientales impredecibles, mientras que su distribución (si es heterogénea) puede reflejar o definir la diferenciación de poblaciones adaptadas a condiciones locales. Este tipo de estructuración genética tiende a ser mayor en poblaciones dulceacuícolas y terrestres, como consecuencia de sus aislamiento geográfico (Mustafa, 1999).

La variación genética es la fuente primaria para el cambio adaptativo, y la diferenciación de poblaciones locales, son parte integral de la biodiversidad de los ecosistemas, y ambas constituyen la base del principio de conservación emitido por la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura) para los ecosistemas acuáticos: “conservar la diversidad genética y la integridad de los ecosistemas mediante un adecuado manejo.

Los atributos que son esenciales para la permanencia de las poblaciones o especies (potencial reproductivo o biológico) dependen de la cantidad y distribución de la variación genética. En este sentido varios estudios han

demostrado que existe una correlación directa entre mayores niveles de variación genética y una mejor respuesta fisiológica y por ende una mayor adaptación a diferentes condiciones ambientales (Mustafa, 1999). Ante lo cual, el monitoreo de la variación genética es importante para una explotación sustentable y para lograr una mayor eficiencia productiva de los recursos pesqueros.

Los grandes avances logrados en el desarrollo de marcadores moleculares y de herramientas de la genómica, han ayudado a mejorar el manejo de las poblaciones o stocks y las condiciones de producción en cautiverio ayudando al desarrollo de programas de mejora genética (Mustafa, 1999).

En este sentido, un requisito indispensable durante la producción en cautiverio mediante la acuicultura, es maximizar los niveles de variación genética y conocer la estructura de las poblaciones naturales que dan origen a los pies de cría con los que se inicia la acuicultura, ya que si la especie que se está produciendo en cautiverio está estructurada genéticamente en la naturaleza, el cruzamiento entre organismos con muy baja diversidad genética podría afectar los rasgos fenotípicos asociados incluyendo la mayoría de interés comercial, como el crecimiento, la supervivencia, la resistencia a enfermedades.

Por lo anterior, los marcadores moleculares han sido utilizados ampliamente para estimar los niveles y la distribución de la variación genética y diversos parámetros de interés ecológico, de conservación y productivos como son: la tasa de migración, tamaños efectivos poblacionales, cuellos de botella, flujo genético, parentescos, etc. (Mustafa, 1999).

Todos los recursos naturales (incluidos los pesqueros) están íntimamente asociados, esta interacción le da relevancia a la gestión de los recursos genéticos, por lo que resulta de vital importancia mantener la diversidad genética para evitar problemas como la endogamia o la disminución del potencial biológico de las especies (FAO, 2014), por lo que se deben realizar monitoreos periódicos de la

diversidad genética de los organismos y especialmente de aquellos recursos que están bajo un régimen de explotación.

La variación genética de una población surge como consecuencia de mutación espontánea de un gen o por la inmigración y apareamiento entre organismos de una población genéticamente diferentes (Yilmaz y Ibrahim, 2002). El número y la abundancia relativa de alelos en una población es una medida de la variación genética (Yilmaz y Ibrahim, 2002). La variación genética se puede medir a diferentes escalas: dentro de las poblaciones o entre las poblaciones y se puede hallar en una especie distribuida uniformemente o en bloques a lo largo de su distribución geográfica y a esto se le conoce como estructura genética poblacional (Mustafa, 2009). La definición de la estructura genética poblacional permite identificar unidades poblacionales.

Para conservar la variación genética en las poblaciones, el primer requisito es la definición correcta de las unidades poblacionales que existen en el área de distribución de un recurso. Una población ha sido definida por diversos autores como: un grupo de individuos de la misma especie que se entrecruzan entre si y que existen juntos en espacio y tiempo (Palumbi, 1994; Reiss, 2009).

La importancia de identificar las unidades poblacionales, radica en conservar las características biológicamente relevantes (potencial reproductivo, crecimiento, supervivencia) de una especie a lo largo de su distribución.

En el caso de los organismos marinos las poblaciones se caracterizan por presentar bajos niveles de diferenciación genética, debido principalmente a la falta de barreras geográficas que impidan el flujo genético, es decir, el intercambio de genes entre los organismos (Palumbi, 1994). Y en el caso de los recursos pesqueros marinos existe poca información sobre la diversidad y estructura (diferenciación) genética y no existe información que permita identificar de una manera correcta las unidades poblacionales, por lo cual, frecuentemente las

unidades e manejo no están relacionadas con las unidades poblacionales (Reiss *et al.*, 2009).

2.5. Estructura genética poblacional en pesquerías.

La estructura genética poblacional en especies con potencial pesquero es importante para el manejo y conservación de una pesquería (Hauser y Ward, 1998). La geografía de un hábitat es un factor importante en la estructuración genética de las poblaciones marinas, ya que en ambientes marinos abiertos sin barreras que impidan la migración, las especies con una alta capacidad de dispersión, representarían una población genéticamente homogénea con un alto flujo genético, a esto se le conoce como una población panmíctica (Allendorf *et al.*, 2013; Ayala y Kiger, 1984), en pesquerías corresponde a un stock pesquero; sin embargo es poco frecuente encontrar este tipo de población en ambientes marinos. Existen estudios que han demostrado que los organismos que cuentan con una gran capacidad de dispersión, mostraran una estructura genética poblacional, influenciada por el ambiente oceánico o por la historia de vida (Hutchinson *et al.*, 2001; Mustafa, 1999; Lovrich, 2007), por lo tanto es importante resaltar que para entender mejor los mecanismos de una población en el medio marino se requiere caracterizar no solo la estructura genética sino también la biología de la especie (Mustafa, 1999).

Otros modelos poblacionales que se pueden identificar son aquellos en los que los miembros de la población tienen acceso a subpoblaciones existentes (modelo de islas; Wright, 1943) y otro en el que las subpoblaciones están cercanas a las más cercanas (modelo de saltos; Kimura, 1953). Por otra parte existe el de aislamiento por distancia, el cual establece que los individuos más cercanos se encuentran más relacionados genéticamente que aquellos que se encuentran distantes (Allendorf *et al.*, 2013). A partir de estos modelos se puede analizar lo que sucede en las frecuencias alélicas de los individuos de una población cuando no se cumplen los supuestos entre las distancias geográficas, el aislamiento entre

poblaciones, los factores ambientales y los rasgos de historia de vida, todo esto con la finalidad de inferir en la dinámica de población (Allendorf *et al.*, 2013).

La interacción entre poblaciones puede resultar variable, lo cual genera la posibilidad de la existencia de un complejo de subpoblaciones a lo largo de la distribución geográfica de la especie, ya que las estrategias de reproducción o la tendencia de volver al sitio donde nacieron (filopatría) de muchos organismos, son factores que marcan y definen la estructuración genética entre unidades poblacionales distintas. Por lo tanto es importante identificar los stocks pesqueros, los patrones de dispersión y la relación entre larvas y adultos, para diseñar planes de manejo que resulten adecuados sobre stocks poblacionales explotados (Botsford *et al.*, 2001). La determinación de un stock pesquero también depende en gran medida de la estructura genética evaluada en las poblaciones y la capacidad de diferenciar unidades genéticas, esto con el uso de marcadores genéticos (Botsford *et al.*, 2001).

2.6 Stock pesquero.

El stock pesquero es definido como un grupo intraespecífico de individuos que se entrecruzan al azar y que poseen una integridad espacial y temporal (Ihssen *et al.*, 1981), la cual se relaciona principalmente con aspectos genéticos, que con frecuencia se definen en base al aislamiento reproductivo (Ovenden, 1990).

Sin embargo, en las poblaciones de organismos marinos son muchas las situaciones en la que la identificación de un stock no es algo fácil de determinar, ya que se caracterizan por presentar una dispersión a gran escala y por lo tanto amplia conectividad, debido a diferentes características tales como; una etapa planctónica de amplia duración, altas tasas de fecundidad y baja divergencia genética (Palumbi, 2004; Levin, 2006).

La valoración de la estructura genética de las poblaciones y la capacidad para identificar esas unidades o stocks pesqueros, depende del uso de herramientas

apropiadas y con alta eficiencia. El empleo de marcadores moleculares hace posible la identificación de stocks pesqueros en una población.

2.7. Marcadores moleculares.

Los marcadores moleculares son regiones del ADN que se transfieren de una generación a otra (Freeland, 2005). Son herramientas utilizadas en la generación de información genética y están basados principalmente en el polimorfismo presente en biomoléculas como las proteínas y los ácidos nucleicos, que al ser analizadas permiten resolver cuestiones en diversos ámbitos como evolución, ecología, taxonomía, diversidad y conservación de los recursos. Los marcadores moleculares permiten observar la variación genética en un genoma (Liu y Cordes, 2004). Dentro de los marcadores más utilizados para conocer la diversidad genética se encuentra el ADN mitocondrial (ADNmt) (Awise, 1994).

El ADN mitocondrial (ADNmt) es una molécula circular en la mayoría de los animales y salvo muy pocas excepciones, se hereda exclusivamente de la madre. Esto es posible debido a que las hembras tienen una contribución mayor que los machos durante la formación del cigoto (Awise, 1994). El análisis del ADNmt, permite identificar las diferencias que existen en las bases nucleotídicas de los organismos, permitiendo comparar dos o más secuencias e identificar el lugar y en qué consisten las diferencias para finalmente conocer las relaciones evolutivas existentes (Freeland, 2005).

El ADNmt es más fácil de amplificar que el ADN nuclear, debido a que existen varias copias dentro de la célula y es haploide y no se somete a recombinación, por lo cual se considera fácil y sencillo de analizar. Se caracteriza por tener un tamaño aproximado de 16.000 pares de bases (pb) y codifica para 37 genes que son transcritos a partir de un único promotor. Codifica 13 subunidades de proteínas de la fosforilación oxidativa, 2 rARNs del ribosoma mitocondrial, y 22 tARNs necesarios para la traslación de proteínas codificadas por el ADN mitocondrial (Boore, 1999). También posee dos zonas no codificantes conocidas

como “región control (o D-loop) y Oril”. Esta última característica hace que el tamaño efectivo poblacional para el ADNmt sea más pequeño que para el nuclear, y por tanto sea muy sensible a fenómenos poblacionales tales como cuellos de botella o hibridaciones” (Boore, 1999).

La región control ha sido ampliamente utilizada en estudios poblacionales al ser un gen que evoluciona más rápido (4-5 veces) que el resto de la molécula del ADNmt (Moritz *et al.*, 1987; Taberlet, 1996). Presenta regiones variables que son típicamente flanqueadas por sitios conservados (por ejemplo ADN ribosomal), para los cuales se pueden diseñar *primers*. Además, es una herramienta barata y permite obtener una visión inicial de la estructura genética de especies no caracterizadas, y representa un método fácil de obtener información sobre la especie en estudio (Galtier *et al.*, 2009).

Debido a esto los estudios realizados con ADNmt se refieren principalmente a esta región, sin embargo el Citocromo b (Cyt b) también es considerado como un gen altamente variable para el análisis poblacional (Kocher *et al.*, 1989) y destaca por ser uno de los genes más estudiados en peces y algunos crustáceos.

Existen otros genes mitocondriales como la Citocromo Oxidasa sub Unidad I, II y III, que han sido utilizados en el análisis de la diversidad y estructura genética de los crustáceos debido a sus características, ya que se considera que también cuentan con cierta actividad polimórfica, y aportan información sobre la condición genética de las poblaciones.

Adicionalmente, el ADNmt codifica proteínas asociadas a los complejos enzimáticos de la membrana interna de la mitocondria que están involucrados en la fosforilación oxidativa y en la cadena de transporte de electrones relacionados con la producción de energía. Los genes mitocondriales implicados en este proceso son las subunidades 1-6 de la NADH deshidrogenasa (NADH-1, NADH-2, NADH-3, NADH-4, NADH-5, NADH-6), el citocromo b (Cyt b), además de las subunidades del complejo ATPasa (ATPasa6 y ATPasa8). Finalmente el ADNmt

también está relacionado con un sistema de traducción que involucra tRNAs y genes ribosomales que codifican la subunidad pequeña (12s), subunidad (18s) y subunidad grande (16s) de los ribosomas mitocondriales, este último cuenta con secuencias relativamente conservadas, es decir, con una tasa de evolución más lenta por lo cual ha sido de gran utilidad en comparaciones genéticas a nivel de especie y género. (Avice, 2004). La historia evolutiva de un solo gen puede resultar diferente en un genoma entero, por lo tanto es importante tener precaución en la interpretación de los datos y por consiguiente en la historia de vida reflejada en los mismos (Stepien y Kocher, 1997).

2.8. Estudios genéticos en Lithodidos.

Los estudios genéticos de poblaciones realizados en lithodidos y específicamente en *L. santolla* son escasos.

El lithodido conocido como “Cangrejo Rey o Cangrejo de Alaska” *Paralithodes camtschaticus* (Tilesius, 1815), es un organismo que ha sido ampliamente estudiado desde hace tiempo dada su importancia comercial para las pesquerías del Pacífico, existiendo muchos estudios, tanto biológicos como genéticos. Es la especie con mayor abundancia y distribución en el Pacífico Norte que se extiende desde el mar de Japón al norte de la Columbia Británica y dentro de los mares de Bearing y Chukchi (Grant y Cheng, 2012) y su alta cercanía a *L. santolla* la convierte en una referencia fundamental en la comparación u obtención de información biológica y genética. Para esta especie Zelenina *et al.* (2008), realizaron un estudio genético comparativo entre especies introducidas y especies nativas, en el cual se identificó el polimorfismo de un gen que codifica la citocromo oxidasa mitocondrial (COI) y cinco loci microsatélites nucleares en cuatro muestras del Mar de Barents y dos poblaciones de donantes de la Kamchatka Occidental y Primorie, observaron que no hubo disminución en la diversidad genética de las poblaciones introducidas y la presencia de bajos niveles de

variación. Se reportó que los niveles de diferenciación genética poblacional se ven afectados por las corrientes marinas y las características geográficas de las zonas.

Estudios más recientes realizados en esta especie con marcadores microsatélites y secuencias del ADN mitocondrial, mostraron un gradiente en la diversidad entre las poblaciones del Noroeste del Pacífico y las poblaciones del Sur del Golfo de Alaska (Vulstek, 2011). Las poblaciones del Noroeste presentaron menor diversidad y estructura genética, que los autores asumieron se debía a la corriente costera de Alaska, que ocasiona un gran flujo de larvas planctónicas hacia las poblaciones situadas a lo largo de la costa del océano del Oeste del Golfo de Alaska, resultando en un mayor intercambio genético y evitando que las poblaciones diverjan unas de otras. Las poblaciones del Sureste de Alaska tuvieron una alta estructuración genética debido al aislamiento provocado por la complejidad geográfica (fiordos y canales). Estudios realizados con marcadores bioquímicos como las alozimas, en las mismas zonas geográficas revelaron bajos niveles de estructuración genética (Seeb *et al.*, 1990; Balakirev y Fedoseev, 2000; Grant *et al.*, 2011).

Finalmente en el Cangrejo Rey se han realizado estudios utilizando secuencias de SNPs (Polimorfismo de un nucleótido); sin embargo, estos marcadores tuvieron bajo poder estadístico (0.26) para detectar diferencias de frecuencias alélicas más pequeñas entre las poblaciones (Grant y Cheng, 2012).

Para la centolla (*L. santolla*) destacan tres estudios principalmente. El primero realizado en el 2007 por Soto *et al.*, en el cual se realizó un análisis genético en la XII Región de Chile, a través de marcadores de ADN (RFLPs) y bioquímicos (alozimas). Los resultados indicaron que la población de *L. santolla* tiene altos niveles de diversidad genética y es panmíctica, definida como una unidad genética, sin embargo no se cuenta con la información completa del estudio, ya que se publicó como poster en un congreso nacional. Además cabe mencionar que las alozimas son considerados marcadores que muestran un bajo

polimorfismo y con bajo confiabilidad para detectar heterocigotos, y la información sobre la variabilidad genética puede considerarse poco confiable.

El segundo realizado en 2015 por Mejía-Ruíz, en el cual se hizo un análisis de la estructura poblacional y diversidad genética en la zona Norte, y Centro-Oeste de la Región de Magallanes y Antártica Chilena mediante el uso de 6 marcadores microsatélites con los cuales se identificó una alta diversidad genética en esas zonas y se definió una unidad genética.

El tercero es un estudio realizado por Pérez-Barros *et al.* (2015), en el cual se analizó la asociación entre caracteres moleculares y morfológicos en la centolla *L. santolla* y *Lithodes confundens* (Decápoda: Anomura) y se evaluó si estas dos morfo-especies constituyen clados recíprocamente monofiléticos a nivel molecular utilizando marcadores mitocondriales como los genes 16s y COI I. Por otra parte se realizó un análisis morfológico del caparazón para buscar la correspondencia entre las diferencias genéticas y morfológicas. La reconstrucción filogenética bayesiana demostró que *L. santolla* y *L. confundens* pertenecen a dos clados hermanos. En este estudio se menciona la importancia de realizar un análisis morfológico más detallado en ambas especies y se resalta la importancia de poner en práctica métodos de genética molecular para el manejo de las pesquerías.

3. JUSTIFICACIÓN.

El escaso conocimiento genético que existe para la especie *L. santolla*, marcan la necesidad de realizar estudios sobre la diversidad y la estructura genética con marcadores moleculares, con los cuales se puede aportar información importante al plan de manejo del recurso, ya que por la accidentada geografía y la existencia de diferentes cuerpos de agua y circulación en estos, es posible asumir la existencia de poblaciones genéticamente diferenciadas (stock pesqueros), con los cuales las medidas de regulación, manejo y conservación podrían considerar rotación de áreas extractivas y periodos diferenciales de veda.

Dentro de los marcadores más utilizados para conocer la diversidad genética se encuentra el ADN mitocondrial, los cuales son eficientes en la definición de unidades genéticas (stocks pesqueros), ayudando a determinar el flujo genético (intercambio de genes) entre individuos de zonas cercanas o alejadas; además de estimar la variación genética existente dentro y entre las poblaciones; es muy sensible para detectar fenómenos poblacionales tales como cuellos de botella o hibridaciones.

El conocimiento sobre la diversidad y la estructura genética mediante marcadores moleculares ha sido una herramienta indispensable para el manejo en las pesquerías de especies marinas comerciales, sin embargo para la centolla (*L. santolla*) existe una limitada información genética disponible, por lo tanto en el presente estudio se analizó la variación y estructura genética de la centolla *L. santolla* en toda la Región de Magallanes y Antártica Chilena, mediante marcadores moleculares de tipo mitocondrial.

4. HIPÓTESIS.

Si, el área de distribución de la centolla *L. santolla* en la Región de Magallanes y Antártica Chilena, está caracterizada por notorios accidentes geográficos (canales, fiordos, bahías, faldas de glaciares entre otros) y por diferentes niveles de explotación pesquera; entonces, existe en esta área de su distribución estructuración genética por aislamiento geográfico y diferentes niveles de variación genética.

5. OBJETIVOS.

5.1. Objetivo general.

Evaluar y analizar la variación y estructura genética de *L. santolla* en la Región de Magallanes y Antártica Chilena, mediante marcadores moleculares de tipo mitocondrial

5.2. Objetivos específicos.

1. Evaluar la variación genética de *L. santolla* en toda el área de su distribución de la Región de Magallanes y Antártica Chilena, mediante genes mitocondriales.
2. Evaluar la estructura genética de *L. santolla* en toda el área de su distribución de la Región de Magallanes y Antártica Chilena, mediante genes mitocondriales.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Obtención de organismos.

Se colectaron organismos de centolla (*L. santolla*) en toda el área de la Región de Magallanes y Antártica Chilena, mediante una embarcación artesanal centollera y bajo un track de investigación (Fig. 11). El muestreo estuvo conformado por tres colectas en temporadas de pesca y no pesca. La primer colecta se realizó en Octubre 2012, la segunda durante los meses de Enero, Febrero y Noviembre de 2013 y la tercera en los meses de Febrero y Marzo de 2015. Con las tres colectas se logró obtener muestras de 69 localidades que son representativas de la pesquería centollera de la Región de Magallanes y Antártica Chilena, definida por Guzmán Ríos en 1985. Como parte de la planeación para realizar este estudio, la Región de Magallanes y Antártica Chilena se dividió en doce zonas de norte a sur (Fig. 11).

El nombre de las localidades correspondientes a cada una de las 12 zonas de muestreo de centolla son las siguientes:

Zona 1: Islas y canales comprendidos entre la costa sur de las islas Wellington y Mornigngton, costa oeste de la península Wilcok, isla Esperanza, isla Diego de Almagro y Jorge Montt (Guarello). Dentro de estas zonas se encuentran las localidades de Isla Esperanza (Canal Esteban), Canal Oeste, Isla Cafiero (Canal Oeste), Isla Topar, Punta Cliffs (Canal Ladrillero, Punta Camello (Canal Ladrillero), Punta Pirámide (Canal Ladrillero), Islote Circel, Isla Cruzoe, Río Frío (Paso Indio), Isla Masón, Seno Heinrich y Canal Adalberto.

Zona 2: Incluye canales adyacentes al canal de sarmiento, a la isla Maldonado a la bahía Parker y al sector del grupo Cuarenta Días e isla Conejo. Las localidades que abarcan son, Isla Hannover (Canal Castro), Isla Maldonado (Canal Uribe), Isla Hannover (Canal Castro).

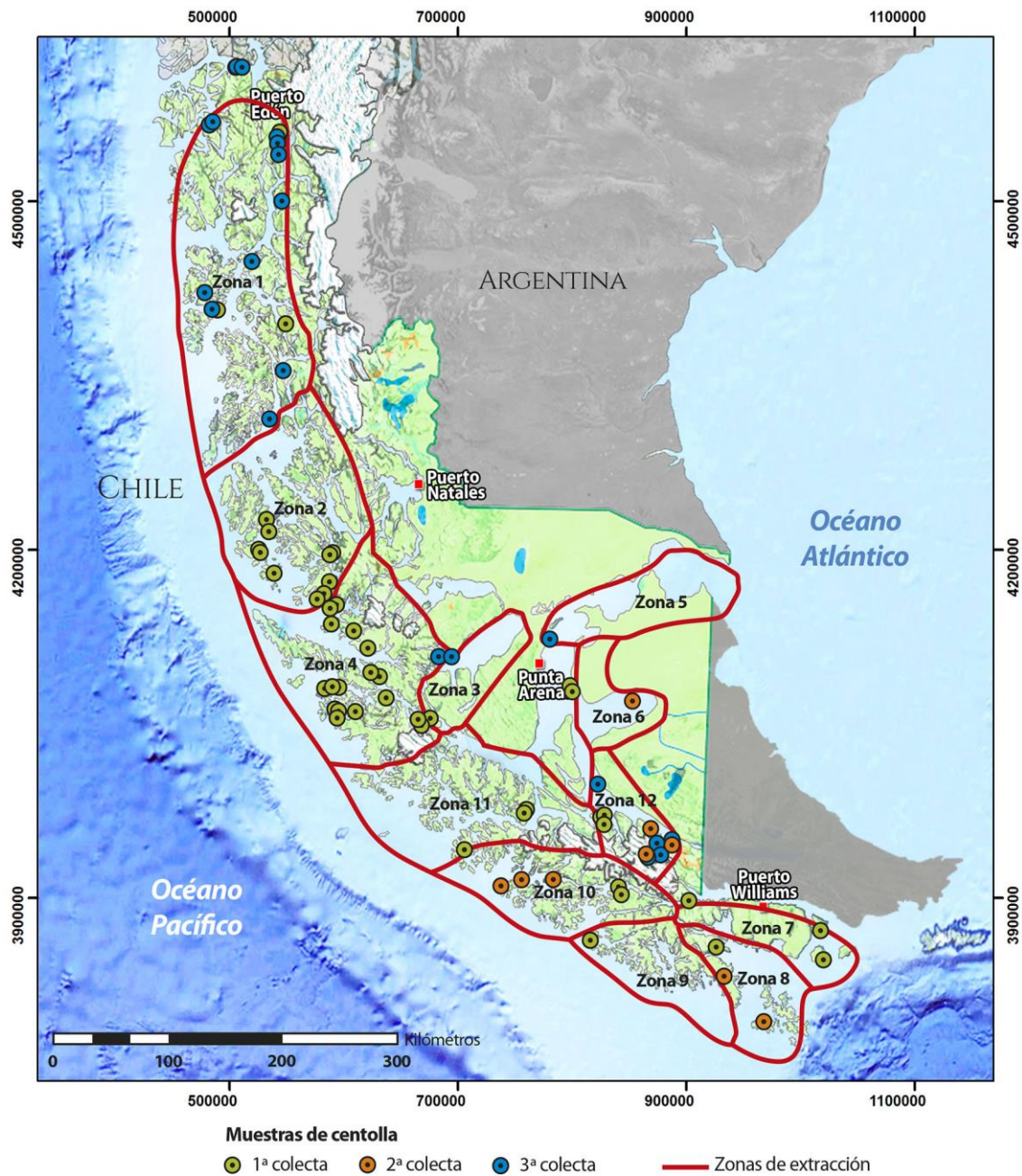


Figura 11. Puntos (sitios) y zonas de muestreo de centolla *L. santolla*, en el área de estudio de la Región de Magallanes y Antártica Chilena. Fuente: Realizado por Carlos Olave y editado por Gabriel Orlando Quilahuilque Márquez, Centro Científico Regional, Fundación CEQUA.

Zona 3: Cubre el sector del seno Otway en la costa occidental de la península de Brunswick y costa sur de la isla Riesco. La localidad presente en esta zona es Caleta Fanny-1.

Zona 4: Abarca el sector de la isla Desolación (canal Abra) y el sector de seno Profundo i la isla Rice Trevor, abarca la localidad Caleta Fanny-2.

Zona 5: Sector oriental del Estrecho de Magallanes incluyendo puerto Zenteno, bahía Santiago y puerto Felipe. Las localidades presentes son; Bahía Laredo.

Zona 6: Incluye el sector de gente grande y Santa María. Localidad de zona Bahía Inútil.

Zona 7: Sector del canal del Beagle (bahía Virginia, bahía Estrella, punta Gusano y Ukika). Localidad muestreada zona 7-01.

Zona 8: Sector del canal Canacus, la península Hardy, el sector de Wollaston y la bahía Windhond, comprende las localidades de Bahía Franklín, y Bahía Orange.

Zona 9: Sector isla Thomas y bahía India. Localidad de Seno año Nuevo y Carolina.

Zona 10: Sector del seno Luisa y del canal Barros Merino y Brazo Inútil. Localidades dentro del muestreo correspondientes a Isla Ramón, Sur de la Isla, Isla Guillermo Obrien, Weste Canal, Canal Ballenero, isla del medio, Jorge.

Zona 11: Abarca islas y canales entre la costa sur de la península Brunswick, seno Agostini, seno Bluff, canal Cockburn, isla Carlos y costa sur de isla Santa Inés. Las localidades presentes destacan Capitán Aracena B. Kempe.

Zona 12: Localidad de Caleta María B. Parry Seno Almirantazgo.

La localización geográfica de los sitios de muestreo, los nombres y número de muestras obtenidas en cada sitio se presentan en la Tabla II.

Tabla II. Localización geográfica de los sitios de muestreo, número de zona a la que pertenecen y número de muestras de *L. santolla* obtenidas en cada localidad de la Región de Magallanes y Antártica Chilena.

NOMBRE DE LOCALIDAD	LOCALIZACIÓN GEOGRÁFICA		ZONA	NÚMERO DE MUESTRAS POR LOCALIDAD
	Latitud Sur	Longitud Oeste		
Isla Masón	4501362	547629	1	23
Río Frío (Paso Indio)	4549724	543747	1	9
Isla Cruzoe	4540395	544834	1	12
Canal Adalberto	4615848	512711	1	14
Seno Heinrich	4617346	507470	1	3
Islote Circel	4616116	506393	1	1
Punta Pirámide (Canal Ladrillero)	4569619	487277	1	14
Punta Camello (Canal Ladrillero)	4565700	483829	1	17
Punta Cliffs (Canal Ladrillero)	4565700	483829	1	6
Isla Topar	4448811	521411	1	21
Isla Cafiero (Canal Oeste)	4407874	486130	1	10
Canal Oeste	4407874	486130	1	13
Isla Esperanza (Canal Esteban)	4353856	548363	1	9
Isla Hannover (Canal Castro)	4312967	536714	2	18
Isla Maldonado (Canal Uribe)	4312967	536714	2	17
Isla Maldonado	4246118	532639	2	11
Fanny-2	4108317	683981	3	3
Fanny-1	4108317	683981	4	22
Bahía Laredo	4129921	379113	5	23
Bahía Inútil	4082610	455640	6	31
Bahía Franklín	3817760	592742	8	27
Bahía Orange	3854128	556249	8	30
Seno Año Nuevo	3868112	495770	9	30
Carolina	3868112	495770	9	30
Isla Ramón, (Sur de la Isla)	3914889	350223	10	20
Isla Guillermo Obrien, Weste Canal	3911484	398766	10	20
Canal Ballenero, isla del medio	3923124	374722	10	20
Jorge	3923124	374722	10	30
Capitán Aracena Bahía Kempe	3981713	370861	11	41
Caleta María B. Parry Seno Almirantazgo	3974883	480315	12	20
Puerto Arturo	4009226	430837	12	11
Caleta María	3963231	500255	12	16
Bahía Parry	3953313	490850	12	16

6.2. Toma de muestras.

Se obtuvieron un total de 588 muestras de músculo de los pleópodos, de machos y hembras adultos de centolla (*L. santolla*). De cada organismo se tomaron variables morfométricas (peso total, longitud y ancho de caparazón). Para los análisis genéticos, la toma de muestras se realizó mediante un corte rectangular en el caparazón de uno de los pleópodos para tomar aproximadamente 10 gr de tejido (Fig.12), la cual se colocó en un tubo falcón de 50 ml con alcohol al 96%. Se almacenó a 4°C para su posterior análisis.

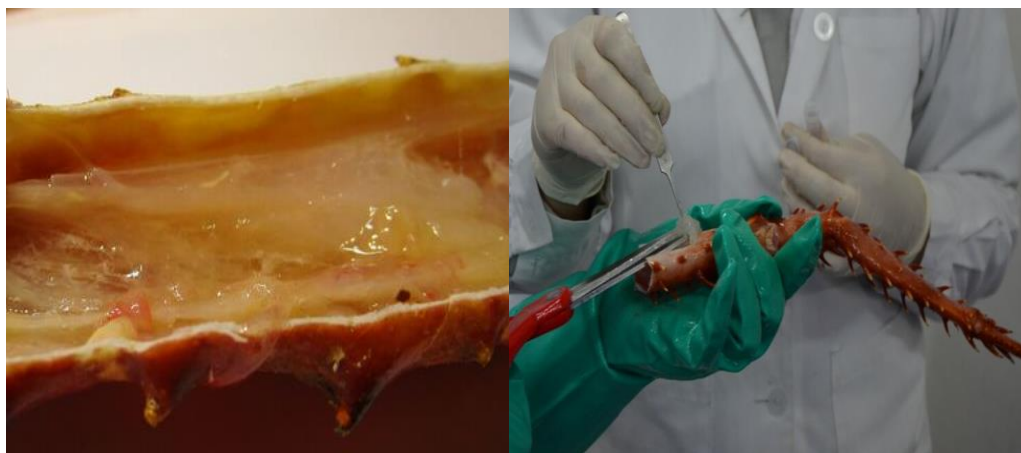


Figura 12. Corte de caparazón de un pleópodo de *L. santolla* para la toma de muestra de músculo. Foto tomada por Manuel Sánchez, Centro Científico Regional, Fundación CEQUA.

6.3. Extracción de ADN.

Para la extracción de ADN genómico total se tomó una cantidad pequeña de tejido muscular (alrededor de 6mm) conservado en alcohol al 96%, se maceró finamente sobre una base de vidrio y se colocó en un tubo ependorf de 1.5mL, adicionando 400µL de buffer de lisis y 20µL de proteínasa K (20mg/mL), incubándolo a 65° durante 12 horas aproximadamente. La extracción de ADN genómico total se llevó a cabo utilizando como base el método de Sales (Salting Out) (Aljanabi y Martínez,

1997), modificado y estandarizado para *L. santolla* en el Laboratorio de Genética y Genómica del Centro Científico Regional, Fundación CEQUA; dicho protocolo se describe detalladamente en el Anexo II.

La calidad del ADN genómico total obtenido se observó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% con GelRed™, empleando el marcador de peso molecular phiX174/Hae III (Promega) y su cuantificación se realizó por medio de un nanodrop 2000c (Thermo Sientific®) en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste CIBNOR. El ADN obtenido se diluyó a una concentración de 40ng/μL y se almacenó en tubos eppendorf de 1.5mL a una temperatura de -20°C.

6.4. Amplificación de ADN mitocondrial.

Para la amplificación de los fragmentos de genes de ADN mitocondrial (ADNmt) se diseñaron primers específicos de la especie mediante el programa primer 3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3/>), a partir del genoma mitocondrial completo de centolla (*L. santolla*) obtenido recientemente por el grupo de genética del Centro Científico Regional, Fundación CEQUA (Acuña-Gómez *et al.*, En preparación) (Tabla III).

Se amplificaron fragmentos de los siguientes 10 genes mitocondriales: Región control, Citocromo Oxidasa Subunidades I, II y III (COI-I, COI-II, COI-III respectivamente), NADH-subunidad 1 y 3, 12S, 16S, 18S y 28S; los cuales se seleccionaron por ser de mayor utilidad en estudios de variación y estructura genética de varias especies de crustáceos.

Tabla III. Iniciadores o Primers diseñados para la amplificación por PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa) de fragmentos de genes de ADN mitocondrial de la centolla (*L. santolla*).

GEN	PRIMER	SECUENCIA DEL PRIMER	TM	GC%	PB	PF
COI-I	Forward	GCTCCAGATATAGCCTTTCCA	62.0	47.6	21	1067
	Reverse	GGATAATCAGAATACCGACGAG	61.3	45.5	22	
COI-II	Forward	GGCTTCTCCCCTAATAGAAC	58.3	50.0	20	581
	Reverse	ACCTATGATTTGCCCCAC	59.8	50.0	18	
COI-III	Forward	CCCTGACCTTTAACTGGCTCT	63.4	52.4	18	669
	Reverse	GCAGCAGCTTCAAATCCA	62.8	50.0	20	
NADH-1	Forward	CAGCCTTTTTCTGACGCAGT	64.4	50.0	20	473
	Reverse	TCTCCCTCAGCAAATCAAAA	63.5	38.1	21	
NADH-3	Forward	GCTCTTCTGTACCTTTCTTAC	54.0	42.9.0	21	333
	Reverse	CACTCTAAAGCACCTTGC	56.0	50.0	18	
18S	Forward	GTGAAACCGCGAATGGCTC	59.5	57.89	19	1390
	Reverse	ATCTCGTGCGGCTAGAGTTG	60.5	55.0	20	
28S	Forward	CGGGTGGAACTCGTAGATCG	62.5	60.0	20	1378
	Reverse	TGTCTGTGGTGCCCTTTGTT	58.4	50.0	20	
16S	Forward	AGAAACCAACCTGGCTCA	57.3	52.63	18	538
	Reverse	AGTTTGGCCTGCTCACTG	57.3	52.63	18	
12S	Forward	CCGATACATCTACCTTTGTTAC	58.4	40.91	21	552
	Reverse	CAGTCGCGGTTATACTTAAAG	57.4	42.86	20	
Región control	Forward	CACGGCCTGTAGAAGAACT	60.5	55.0	20	1328
	Reverse	CCACGACTTCGTTATGATAAGC	60.3	45.45	22	

TM: Temperatura de alineamiento de primers; **GC%:** Contenido de GC (guanina y citosina); **PB:** Pares de bases; **PF:** Producto Final.

La amplificación de los fragmentos de los genes mitocondriales se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) utilizando un termociclador BioRad™ y uno Applied Biosystems® 2700, variando la concentración de magnesio en la mezcla de reacción de la PCR; así como la temperatura de alineación (Anexo IV). En general las reacciones utilizadas fueron de 15µL, 0.3µL de primer a una concentración de 10µM de cada primer, 10 mM, de DNTP's (0.3µL), 1 X de Buffer para PCR, 2.5 mM de MgCl₂ y 0.625 U de TAQ polimerasa. Las amplificaciones se realizaron con las siguientes condiciones: Un paso de desnaturalización inicial a 94°C durante 3 minutos seguido por 42 ciclos de desnaturalización a 94°C de 30 segundos, una alineación a 62°C, 62°C, 63.8°C, 52°C, 64°C, 52.7°C, 59°C y 57.6°C, para los genes 16S, 12S, COI-I, COI-II, COI-III, NADH-1 y NADH-3 respectivamente; La extensión consistió de un periodo de 1:30 minutos a una temperatura de 72°C y finalmente una extensión final de 15 minutos a 72°C.

Para los genes 18S y 28S las condiciones de la PCR fueron las siguientes: Una desnaturalización inicial 94°C durante 5 min, 23 y 30 ciclos respectivamente con una desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, una temperatura de alineación de 64°C durante 20 segundos, una extensión a 72°C por 30 segundos y finalmente una extensión final de 10 min a 72°C.

Las condiciones para la Región control fueron las siguientes: una desnaturalización inicial a 95°C durante 5 min, durante 22 ciclos con una desnaturalización a 95°C con un lapso de 1 min, una alineación a 68°C durante 3 min, una extensión de 3:30 min a 72°C y una extensión final de 20 min a 72°C. Todos los análisis y la estandarización de las condiciones para la amplificación de los genes se realizaron en el laboratorio de Genética y Genómica de Centro Científico Regional, Fundación CEQUA en Punta Arenas, Chile y en el laboratorio de Inmunogenómica Marina del CIBNOR.

Todos los productos de amplificación obtenidos se enviaron a secuenciar a Macrogen, Inc. (Korea).

6.5. Análisis de secuencias de fragmentos de genes mitocondriales.

La visualización, edición y alineamiento de las secuencias se realizó utilizando el programa BIOEDIT Sequence Alignment Editor (Hall, 1999) y el programa ChromasPro (versión 1.7.7). Mediante el programa BIOEDIT (Sequence Alignment Editor) se realizaron correcciones y errores de secuenciación mediante el “Contig” producido entre las secuencias. Se realizaron búsquedas en Gen Bank-NCBI utilizando el algoritmo Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) para la verificación de la identidad de las secuencias. Se realizaron alineamientos múltiples mediante el algoritmo de Thompson *et al.* (1998), empleando el programa Clustal W [en MacVector versión 7.2; Accelrys, Madison, WI], se utilizaron como referencia secuencias disponibles en la base de datos GenBank del cangrejo real o cangrejo rey *Paralithodes camtschaticus* (subarctic red king crab), especie que se utilizó de “referencia” debido a que es cercana evolutivamente a la centolla (*L. santolla*) y a que ya existe la secuenciación completa de su genoma mitocondrial (Kim *et al.*, 2013). Las secuencias del cangrejo real o cangrejo rey *Paralithodes camtschaticus* no tuvieron influencia en los análisis de este estudio.

Las secuencias alineadas fueron introducidas en un archivo GCG (msf) en el programa MacClade 4.0 (Maddison y Maddison, 2011) para la edición de la matriz de secuencias. Las secuencias fueron comparadas para evaluar la composición en términos de nucleótidos, el porcentaje de transiciones y de transversiones, y el número de sitios polimórficos o sus longitudes. Se exploró en las regiones secuenciadas las regiones más conservadas y variables.

6.6. Obtención de parámetros genéticos poblacionales.

6.6.1. Variación genética.

Los datos obtenidos se convirtieron en formato binario, construyendo una matriz. Los parámetros estimados para evaluar la variación genética fueron: número de haplotipos (N_h), diversidad haplotípica (H_d) diversidad nucleotídica (π), la cual mide la probabilidad de que dos nucleótidos homólogos escogidos al azar en una

muestra sean diferentes (Nei y Tajima, 1981) y finalmente la diversidad haplotípica (H_d), que es la probabilidad de tomar dos haplotipos idénticos en una muestra (Nei, 1987), es decir, de manera general se refiere al número promedio de diferencias nucleotídicas por sitio entre dos secuencias seleccionadas al azar (McElroy, *et al.*, 1991; Rozas *et al.*, 2003). Todo esto se realizó con ayuda de los programas DnaSP versión 5.1 (Librado y Rozas, 2003) y GENEPOP versión 4.0 (Rousset, 2008) y del programa, ARLEQUIN versión 3.5 (Excoffier y Lischer, 2010).

6.6.2. Estructura genética.

Con la finalidad de medir la diferenciación entre las localidades se estimó el índice de fijación ϕ_{st} (Weir y Cockerham, 1984), índice análogo al F_{st} pero que incluye información haplotípica, dicho parámetro oscila entre valores de 0 a 1, en el cual el más cercano a 0 indica una baja diferenciación genética, mientras los más cercanos a 1 indican diferencias genéticas entre los individuos. El ϕ_{st} se obtiene a partir del coeficiente estimado de la varianza de las diferencias entre las poblaciones e incorpora información del grado de diferenciación molecular entre las secuencias, así como la frecuencia de los haplotipos en cada población (Excoffier *et al.*, 1992; Michalakis y Excoffier, 1996), lo anterior se determinó con ayuda del programa ARLEQUIN versión 3.1. Con los valores obtenidos de ϕ_{st} , se realizó un AMOVA (Análisis de Varianza Molecular), para estimar la diferenciación genética entre las localidades muestreadas, usando el programa ARLEQUIN versión 3.1 (Schneider *et al.*, 2000). Para estimar el aislamiento por distancia se utilizó la prueba de Mantel (1967), la cual permite evaluar una posible correlación entre la distancia genética, dada por el estadístico de Nei (1972) y la distancia geográfica. Para dicho análisis se utilizó el programa XLSTAT versión 2012.

7. RESULTADOS

7.1. Obtención de organismos.

Durante las tres colectas realizadas se obtuvo un total de 588 organismos y de cada uno se logró obtener muestras de músculo, logrando obtener muestras de toda la Región de Magallanes y Antártica Chilena (Fig. 11, sección de materiales y métodos), y dentro de ella se logró obtener muestras de 69 localidades pesqueras de la región (Tabla II, sección materiales y métodos). El número total de machos fue de 399 y de hembras fue de 189.

7.2. Extracción de ADN de músculo de *L. santolla*.

Se estandarizó un método de extracción de ADN de tejido muscular basado en el método de Sales (Salting Out) (Aljanabi y Martínez, 1997), con el cual se obtuvo en promedio 1736.21ng/uL de ADN genómico (Anexo V). En la tabla IV se presenta el número de muestras de músculo de las cuales se realizó la extracción de ADN genómico y la amplificación por PCR punto final de cada uno de los genes mitocondriales analizados.

Tabla IV. Número de muestras de *L. santolla* amplificadas por PCR punto final y porcentaje de éxito en la secuenciación de fragmentos de genes mitocondriales.

Gen	Número de muestras (PCR) amplificadas	Número de secuencias obtenidas	Porcentaje de éxito
COI I	528	528	100
16S	531	531	100
12S	417	417	100
Región control	252	252	100
COI II	417	417	100
COI III	384	384	100
NADH-3	443	443	100
NADH-1	303	303	100
18S	555	555	100
28S	443	443	100
Total	4273	4273	100

7.3. Amplificación de fragmentos genes mitocondriales.

Durante el desarrollo de esta investigación se logró la amplificación por PCR punto final de 10 fragmentos de genes mitocondriales (Tabla IV, Anexo VI), obteniéndose el 100% de éxito.

7.4. Verificación de la identidad de secuencias de genes mitocondriales.

Se obtuvo un total de 4273 secuencias del análisis de amplificación de los 10 fragmentos de genes mitocondriales amplificados (Tabla IV).

En la tabla V, se presentan los resultados, del análisis realizado con cada una de las secuencias en la base de datos del GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov). Todas las posiciones con *gaps* y los datos perdidos fueron eliminados. Después de realizar la alineación no se detectó ningún *gap* o brecha, lo cual es un indicador de una adecuada alineación.

Todas las secuencias tuvieron un alto porcentaje de identidad con secuencias que corresponden a especies de crustáceos de la familia Lithodidae, la mayoría de los cuales son del género *Lithodes*, como *L. nintokuae*, *L. confundes* y el Cangrejo Rey *Paralithodes camtschaticus*.

La composición nucleotídica promedio de las secuencias analizadas fue de 27.7% de timina (T), 26.6% citosina (C), 27.9% de adenina (A) y 17.8% guanina (G). Además, se obtuvo los porcentajes para GC (44.36%) y GT (45.49%).

Se encontró la relación entre el número de transiciones y transversiones comparando las secuencias obtenidas de a pares, empleando el modelo de sustitución nucleotídica de Tamura y Nei (1993) con un bootstrap de 10000, la tasa de sustitución por sitio bajo el parámetro gamma (5 categorías, parámetro 0.0500). Las transiciones y transversiones no presentan saturación, por lo tanto dichas secuencias son óptimas para la construcción de árboles filogenéticos, además las distancias entre pares de secuencias son pequeñas.

Los resultados del análisis de identidad confirman que las secuencias obtenidas en este estudio a partir del ADN genómico extraído del músculo de los organismos muestreados corresponden a la especie *L. santolla* y todas fueron depositadas en el Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Tabla V. Porcentaje (%) de identidad de las secuencias de ADN de *Lithodes santolla* obtenidas de cada uno de los fragmentos de genes mitocondriales.

Fragmento del gen	Pares de bases (Pb)	Identidad (%)	Género/Especie	Gen Bank ID
COI	1000	92	<i>Lithodes nintokuae</i>	AB769476
		76	<i>Lithodes confundes</i>	HM020901
		89	<i>Paralithodes camtschaticus</i>	JX944381
16S	546	99	<i>Lithodes santolla</i>	KF182572
		97	<i>Lithodes nintokuae</i>	AF425331
		97	<i>Lithodes aequispinus</i>	AB769476
12S	565	96	<i>Lithodes nintokuae</i>	AF425329
		97	<i>Paralithodes camtschaticus</i>	AB769476
			<i>Paralithodes brevipes</i>	JX944381
Región control	700	73	<i>Lithodes nintokuae</i>	AB735677
		82	<i>Paralithodes camtschaticus</i>	AB769476
COI II	512	99	<i>Lithodes santolla</i>	JX944381
		95	<i>Lithodes aequispinus</i>	AF425370
		92	<i>Lithodes maja</i>	AF425368
COI III	654	90	<i>Lithodes nintokuae</i>	AF415369
		89	<i>Paralithodes camtschaticus</i>	AB769476
				JX944381
NADH-3	303	92	<i>Lithodes nintokuae</i>	AB769476
		89	<i>Paralithodes camtschaticus</i>	JX944381
NADH-1	442	93	<i>Lithodes nintokuae</i>	JX944381
		94	<i>Paralithodes camtschaticus</i>	AB769476
18S	1195	92	<i>Lithodes santolla</i>	JX944381
28S	1364	91	<i>Cryptolithodes typicus</i>	KF182452
		88	<i>Lithodes santolla</i>	AF436019
				KF182602
				AY596100

7.5. Obtención de parámetros genéticos.

7.5.1. Variación genética.

En las tablas VI y VII se presentan los índices de variación genética (diversidad haplotípica (H_d) y diversidad nucleotídica (π) obtenidos con el análisis de los fragmentos de los genes mitocondriales (COI I, COI II, COI III, 12S, 16S, 18S, Región control, NADH-1 y NADH-3) de *L. santolla*, en las 11 zonas de muestreo de la Región de Magallanes y Antártica Chilena.

El tamaño (pares de bases) de los fragmentos de cada uno de los genes mitocondriales analizados se presenta en las tablas VI y VII. El número de haplotipos (N_h) por zona de colecta vario de 2-27 en COI I, en NADH-1 1-15, en NADH-3 3-15, en 18S 1-20, en COI III 2-27, COI II 2-24, en Región control 3-39, en 12S 2-20, en 16S 2-12. El mayor número de haplotipos se obtuvo en la zona 1 (ubicada en el Norte de la región, Fig.11) y en las zonas 8, 9 y 12 (ubicadas en el Sur de la región, Fig.11), y el menor número en las zonas 3, 4 y 5 (ubicada en el área Central de la región, Fig.11). En general del análisis de los genes mitocondriales se obtuvo un número particularmente elevado de haplotipos (Tablas VI y VII), esto indica una alta variabilidad.

Las diferentes zonas de colecta presentaron en general altas diversidades haplotípicas (H_d). Las diversidades haplotípicas más altas se obtuvieron con el fragmento de la Región control (Tabla VI) y las más bajas se obtuvieron con el 16S (Tabla VII).

Los más bajos valores de diversidad haplotípica se presentaron en las zonas 3, 4 y 5 (ubicada en el área central de la región, Fig.11) con todos los genes analizados.

La zona 1, ubicada en el Norte de la región y las zonas 8, 9 y 12, ubicadas al Sur de la región, presentaron los valores más altos de diversidad haplotípica con todos los genes analizados.

Las diversidades nucleotídicas (π) obtenidas con el análisis de cada uno de los genes mitocondriales en general fueron altas (Tablas VI y VII). Los valores más altos se obtuvieron en las zona 1 (ubicada al Norte de la región, Fig. 13), 8, 9 y 12 (ubicadas al Sur de la región, Fig. 13), y los más bajos valores se obtuvieron en las zonas 3, 4 y 5 (ubicadas en el área central de la región, Fig. 13).

Tabla VI. Índices de variación genética (diversidad haplotípica, Hd y diversidad nucleotídica, π obtenidos en la centolla *L. santolla* con los fragmentos de los genes mitocondriales COI I, 16S, 12S, región control y COI II, en las 11 zonas de muestreo de la Región de Magallanes y Antártica Chilena.

GEN		ZONAS											Prom.
		1	2	3	4	5	6	8	9	10	11	12	
COI I (839 pb)	Nh	27	12	3	6	8	12	20	22	12	12	22	
	Hd	0.898	0.830	0.589	0.402	0.431	0.721	0.899	0.802	0.898	0.873	0.830	0.743
	π	0.020	0.020	0.011	0.011	0.010	0.013	0.017	0.013	0.012	0.010	0.016	0.013
16S (459 pb)	Nh	12	3	2	6	4	9	12	10	9	8	12	
	Hd	0.446	0.470	0.348	0.313	0.337	0.438	0.426	0.468	0.434	0.437	0.448	0.415
	π	0.014	0.012	0.010	0.010	0.011	0.013	0.014	0.014	0.014	0.013	0.014	0.012
12S (555 pb)	Nh	20	11	2	5	3	2	20	18	11	11	18	
	Hd	0.508	0.637	0.319	0.337	0.287	0.409	0.777	0.748	0.596	0.586	0.713	0.537
	π	0.015	0.015	0.010	0.011	0.010	0.014	0.014	0.015	0.014	0.014	0.014	0.013
Región control (608 pb)	Nh	29	8	3	12	9	22	22	21	22	17	22	
	Hd	0.999	0.999	0	0.996	0	0.972	0.998	0.982	0.982	0.998	0.986	0.810
	π	0.018	0.012	0.010	0.010	0.010	0.011	0.014	0.018	0.014	0.018	0.017	0.013
COI II (545 pb)	Nh	24	9	2	10	11	10	14	18	17	14	20	
	Hd	0.877	0.695	0.466	0.483	0.447	0.618	0.842	0.817	0.864	0.845	0.881	0.730
	π	0.018	0.012	0.010	0.010	0.010	0.013	0.017	0.018	0.013	0.013	0.016	0.013

Nh: Número de Haplotipos; **Hd:** Diversidad Haplotípica; **π :** Diversidad Nucleotídica. **pb:** pares de bases.

Tabla VII. Índices de variación genética (diversidad haplotípica, Hd y diversidad nucleotídica, π obtenidos en la centolla *L. santolla* con los fragmentos de los genes mitocondriales COI III, NADH-1, NADH-3 y 18S, en las 11 zonas de muestreo de la Región de Magallanes y Antártica Chilena.

GEN		ZONAS											Prom.
		1	2	3	4	5	6	8	9	10	11	12	
COI III (616 pb)	Nh	27	12	2	7	6	15	20	17	17	8	22	
	Hd	0.919	0.961	0.234	0.325	0.348	0.898	0.881	0.765	0.871	0.894	0.884	0.725
	π	0.018	0.013	0.010	0.010	0.010	0.011	0.014	0.014	0.015	0.018	0.018	0.013
NADH-1 (291 pb)	Nh	10	8	2	2	2	10	9	9	9	8	8	
	Hd	0.908	0.837	0.446	0.637	0.617	0.709	0.861	0.748	0.996	0.886	0.913	0.721
	π	0.017	0.014	0.010	0.010	0.010	0.010	0.016	0.017	0.014	0.013	0.016	0.013
NADH-3 (442 pb)	Nh	18	8	3	7	11	7	12	12	10	9	17	
	Hd	0.921	0.838	0.321	0.338	0.235	0.696	0.649	0.859	0.671	0.686	0.786	0.636
	π	0.019	0.011	0.011	0.014	0.012	0.012	0.013	0.013	0.012	0.013	0.013	0.013
18S (442 pb)	Nh	24	9	2	9	6	7	17	16	15	10	20	
	Hd	0.998	0.914	0.221	0.205	0.254	0.987	0.757	0.986	0.974	0.880	0.775	0.703
	π	0.016	0.011	0.010	0.010	0.011	0.016	0.016	0.016	0.014	0.0114	0.016	0.013

Nh: Número de Haplotipos; **Hd:** Diversidad Haplotípica; **π :** Diversidad Nucleotídica; **pb:** pares de bases

7.5.2. Estructura genética.

7.5.2.1. Índice de fijación ϕ_{st} .

El índice de fijación ϕ_{st} (*análogo al F_{st}*) obtenido para los genes mitocondriales analizados se presentan en las tablas VIII a la XII.

Los valores de ϕ_{st} pareados para todas las zonas de muestreo y para los diferentes genes variaron desde 0 hasta 0.59 con un promedio de 0.15. El 100% de las comparaciones (con todos los genes) tuvieron bajos valores de diferenciación genética (medida mediante los valores de ϕ_{st}), y aunque algunos fueron estadísticamente significativos los valores de ϕ_{st} indican que no existen diferencias genéticas entre ninguna de las zonas muestreadas, por lo que no se prosiguió a realizar comparaciones entre localidades de cada una de las zonas (comparaciones inter-poblacionales).

Tabla VIII. Índice de fijación ϕ_{st} (Weir y Cockerham, 1984), para el fragmento del gen COI I de *L. santolla* en las 11 zonas de muestreo de la Región de Magallanes y Antártica Chilena. Arriba de la diagonal valores de significancia y bajo la diagonal valores de ϕ_{st} .

ZONA	1	2	3	4	5	6	8	9	10	11	12
1		0.163	0.845	0.158	0.147	0.034	0.058	0.006	0.000	0.081	0.009
2	0.005		0.495	0.287	0.543	0.257	0.231	0.106	0.064	0.734	0.296
3	-0.13	-0.10		0.560	0.386	0.454	0.657	0.177	0.764	0.509	0.453
4	0.007	0.006	-0.07		0.224	0.757	0.678	0.216	0.699	0.516	0.796
5	0.009	-0.004	-0.019	0.011		0.679	0.434	0.938	0.452	0.719	0.515
6	0.018*	0.006	-0.062	-0.010	-0.009		0.170	0.443	0.243	0.349	0.518
8	0.014	0.005	-0.150	-0.004	-0.000	0.006		0.033	0.105	0.079	0.222
9	0.024*	0.012	-0.086	-0.013	-0.020	-0.000	0.019*		0.006	0.099	0.039
10	0.023*	0.012	-0.123	-0.006	-0.000	0.003	0.008	0.014*		0.030	0.021
11	0.008	-0.060	-0.108	-0.002	-0.007	0.001	0.008	0.007	0.001*		0.483
12	0.015*	0.002	-0.122	-0.010	-0.004	-0.001	0.003	0.008*	0.007*	-0.000	

*: Valores con un grado de significancia $p < 0.05$.

Tabla IX. Índice de fijación ϕ_{st} (Weir y Cockerham, 1984), para el fragmento del gen 16S y 12S de *L. santolla* en las 11 zonas de muestreo de la Región de Magallanes y Antártica Chilena. Arriba de la diagonal valores de significancia y bajo la diagonal valores de ϕ_{st} .

ZONA	1	2	3	4	5	6	8	9	10	11	12
	1		0.002	0.999	0.083	0.017	0.02	0.003	0.007	0.000	0.001
2	0.103*		0.999	0.806	0.789	0.430	0.073	0.104	0.327	0.146	0.135
3	-0.160	-0.329		0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999
4	0.046	-0.010	-0.320		0.795	0.797	0.705	0.665	0.717	0.622	0.384
5	0.070*	-0.005	-0.326	-0.009		0.166	0.161	0.150	0.571	0.671	0.146
6	0.053*	-0.001	-0.318	-0.012	-0.003		0.166	0.234	0.706	0.298	0.060
8	0.062*	0.036	-0.306	-0.012	0.023	0.012		0.866	0.327	0.308	0.411
9	0.058*	0.028	-0.311	-0.013	0.017	0.011	-0.012		0.311	0.334	0.590
10	0.032*	-0.008	-0.317	-0.017	-0.010	-0.008	0.007	0.003		0.225	0.286
11	0.063*	0.015	-0.317	-0.010	-0.011	0.004	0.004	0.002	0.001		0.649
12	0.089*	0.034	-0.331	-0.007	0.004	0.020	-0.001	-0.003	0.012	-0.006	

ZONA	1	2	3	4	5	6	8	9	10	11	12
	1		0.048	0.632	0.182	0.071	0.511	0.0	0.005	0.016	0.007
2	0.030*		0.999	0.328	0.163	0.744	0.0	0.356	0.098	0.930	0.128
3	-0.008	-0.140		0.999	0.999	0.999	0.0	0.930	0.999	0.999	0.999
4	0.014	0.002	-0.173		0.409	0.999	0.0	0.573	0.428	0.634	0.737
5	0.040	0.023	-0.193	-0.019		0.999	0.0	0.511	0.444	0.541	0.783
6	-0.021	-0.030	-0.184	-0.066	-0.049		0.0	0.828	0.907	0.826	0.999
8	0	0	0	0	0	0		0.0	0.0	0.0	0.0
9	0.040*	0.002	-0.179	-0.009	-0.004	-0.040	0		0.542	0.446	0.161
10	0.043*	0.020	-0.161	-0.005	-0.004	-0.038	0	-0.002		0.063	0.262
11	0.048*	-0.011	-0.180	-0.007	-0.001	-0.038	0	-0.000	0.015		0.287
12	0.049*	0.016	-0.191	-0.016	-0.021	-0.045	0	0.005	0.005	0.002	

*: Valores con un grado de significancia $p < 0.05$.

Tabla X. Índice de fijación ϕ_{st} (Weir y Cockerham, 1984), para el fragmento del gen Región control y COI II de *L. santolla* en las 11 zonas de muestreo de la Región de Magallanes y Antártica Chilena. Arriba de la diagonal valores de significancia y bajo la diagonal valores de ϕ_{st} . Arriba de la diagonal valores de significancia y bajo la diagonal valores de ϕ_{st} .

ZONA	1	2	3	4	5	6	8	9	10	11	12	
REGIÓN CONTROL	1		0.022	0.913	0.693	0.018	0.027	0.001	0.000	0.000	0.000	0.029
	2	0.032*		0.431	0.222	0.037	0.156	0.054	0.009	0.030	0.009	0.047
	3	-0.047	0.003		0.099	0.765	0.454	0.431	0.921	0.932	0.569	0.705
	4	-0.006	0.016	-0.060		0.131	0.387	0.248	0.530	0.298	0.040	0.284
	5	0.035*	0.059*	-0.043	0.019		0.000	0.000	0.000	0.000	0.017	0.003
	6	0.022*	0.019	-0.005	0.001	0.094*		0.637	0.634	0.596	0.000	0.566
	8	0.026*	0.030	0.001	0.006	0.077*	-0.005		0.002	0.013	0.000	0.257
	9	0.021*	0.036*	-0.044	-0.002	0.059*	-0.004	0.013*		0.711	0.000	0.051
	10	0.021*	0.025*	-0.041	0.003	0.060*	-0.003	0.014*	-0.003		0.000	0.123
	11	0.055*	0.062*	-0.010	0.028*	0.050*	0.079*	0.088*	0.047*	0.056*		0.000
	12	0.012*	0.031*	-0.023	0.005	0.057*	-0.003	0.003	0.010	0.006	0.084*	
	ZONA	1	2	3	4	5	6	8	9	10	11	12
COI II	1		0.030	0.735	0.294	0.177	0.086	0.474	0.059	0.218	0.019	0.000
	2	0.039*		0.999	0.416	0.514	0.972	0.528	0.673	0.115	0.662	0.461
	3	-0.071	-0.155		0.723	0.751	0.999	0.999	0.834	0.724	0.765	0.572
	4	0.003	-0.002	-0.104		0.731	0.534	0.544	0.888	0.667	0.919	0.329
	5	0.012	-0.005	-0.104	-0.020		0.792	0.299	0.947	0.554	0.575	0.251
	6	0.041	-0.004	-0.122	-0.009	-0.027		0.313	0.767	0.301	0.768	0.785
	8	-0.012	-0.016	-0.147	-0.014	0.011	0.018		0.467	0.341	0.382	0.310
	9	0.018	-0.012	-0.118	-0.021	-0.024	-0.024	-0.013		0.401	0.789	0.205
	10	0.005	0.024	-0.083	-0.013	-0.010	0.012	0.006	-0.001		0.148	0.013
	11	0.034*	-0.011	-0.111	-0.023	-0.008	-0.023	-0.004	-0.011	0.014		0.608
	12	0.061*	-0.003	-0.088	0.003	0.007	-0.027	0.013	0.007*	0.037	-0.005	

*: Valores con un grado de significancia $p < 0.05$

Tabla XI. Índice de fijación ϕ_{st} (Weir y Cockerham, 1984), para el fragmento del gen COI III y 18S de *L. santolla* en las 11 zonas de muestreo de la Región de Magallanes y Antártica Chilena. Arriba de la diagonal valores de significancia y bajo la diagonal valores de ϕ_{st} .

ZONA		1	2	3	4	5	6	8	9	10	11	12
COI III	1		0.642	0.728	0.015	0.176	0.026	0.021	0.005	0.019	0.278	0.000
	2	-0.016		0.695	0.562	0.371	0.393	0.133	0.393	0.520	0.480	0.010
	3	-0.167	-0.189		0.681	0.645	0.691	0.692	0.374	0.687	0.397	0.576
	4	0.065*	0.001	-0.287		0.232	0.064	0.048	0.025	0.042	0.426	0.005
	5	0.032	0.013	-0.109	0.001		0.456	0.834	0.648	0.316	0.292	0.532
	6	0.035*	-0.001	-0.142	0.052	-0.011		0.487	0.060	0.436	0.372	0.133
	8	0.053*	0.036	-0.087	0.038*	-0.035	-0.005		0.520	0.212	0.320	0.843
	9	0.038*	0.000	-0.158	0.076*	-0.022	-0.006	-0.004		0.155	0.673	0.014
	10	0.027*	-0.014	-0.179	0.072*	0.005	-0.005	0.016	0.009		0.232	0.018
	11	0.020	-0.006	0.002	-0.013	0.007	-0.003	0.006	-0.028	0.018		0.134
	12	0.088*	0.087*	-0.044	0.106*	-0.014	0.014	-0.017	0.025*	0.038*	0.043	
	ZONA		1	2	3	4	5	6	8	9	10	11
18S	1		0.000	0.165	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	2	0.206*		0.999	0.002	0.012	0.000	0.547	0.000	0.000	0.131	0.000
	3	0.078	-0.171		0.685	0.699	0.008	0.999	0.005	0.007	0.999	0.703
	4	0.169*	0.116*	-0.068		0.461	0.000	0.001	0.000	0.000	0.263	0.156
	5	0.177*	0.105*	-0.068	-0.009		0.000	0.002	0.000	0.000	0.310	0.193
	6	0.201*	0.529*	0.323*	0.441*	0.460*		0.000	0.009	0.000	0.000	0.000
	8	0.229*	-0.006	-0.196	0.102*	0.089*	0.595*		0.000	0.000	0.054	0.000
	9	0.136*	0.325*	0.165*	0.261*	0.273*	0.037*	0.379*		0.978	0.000	0.000
	10	0.135*	0.297*	0.158*	0.245*	0.255*	0.042*	0.338*	-0.006		0.000	0.000
	11	0.205*	0.029	-0.133	0.008	0.002	0.539*	0.021	0.330*	0.299*		0.000
	12	0.158*	0.089*	-0.068	0.010	0.010	0.423*	0.113*	0.024*	0.229*	0.057*	

*: Valores con un grado de significancia $p < 0.05$

Tabla XII. Índice de fijación ϕ_{st} (Weir y Cockerham, 1984), para el fragmento del gen NADH-1 y NADH-3 de *L. santolla* en las 11 zonas de muestreo de la Región de Magallanes y Antártica Chilena. Arriba de la diagonal valores de significancia y bajo la diagonal valores de ϕ_{st} .

ZONA	1	2	3	4	5	6	8	9	10	11	12
	1		0.224	0.999	0.029	0.0	0.000	0.006	0.005	0.006	0.492
2	0.022		0.990	0.475	0.0	0.003	0.003	0.013	0.026	0.391	0.010
3	-0.254	-0.393		0.712	0.0	0.297	0.474	0.548	0.458	0.999	0.517
4	0.073*	-0.02	-0.436		0.0	0.000	0.000	0.008	0.024	0.279	0.000
5	0.0	0.0	0.0	0.0		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
6	0.178*	0.082*	-0.046	0.056*	0.0		0.000	0.011	0.116	0.042	0.090
8	0.119*	0.106*	-0.098	0.109*	0.0	0.119*		0.010	0.001	0.046	0.000
9	0.083*	0.065*	-0.305	0.039*	0.0	0.031*	0.041*		0.412	0.185	0.000
10	0.087*	0.052*	-0.247	0.028*	0.0	0.012	0.065*	-0.000		0.176	0.000
11	-0.033	-0.004	-0.722	0.008	0.0	0.163*	0.146*	0.043	0.047		0.078
12	0.143*	0.070*	-0.229	0.065*	0.0	0.014	0.080*	0.046*	0.036*	0.092	

ZONA	1	2	3	4	5	6	8	9	10	11	12
	1		0.270	0.703	0.091	0.602	0.000	0.000	0.000	0.000	0.132
2	0.006		0.624	0.699	0.256	0.007	0.009	0.014	0.008	0.842	0.883
3	-0.083	-0.053		0.429	0.807	0.193	0.485	0.170	0.189	0.701	0.322
4	0.028	-0.027	-0.045		0.186	0.224	0.120	0.178	0.102	0.558	0.812
5	-0.008	0.012	-0.102	0.030		0.000	0.099	0.000	0.000	0.609	0.004
6	0.116*	0.121	0.129	0.022	0.202*		0.077	0.762	0.930	0.000	0.001
8	0.182*	0.055	-0.107	0.040	0.077	0.083		0.005	0.002	0.039	0.000
9	0.132*	0.113*	0.058	0.020	0.214*	-0.015	0.126*		0.6649	0.000	0.000
10	0.143*	0.136*	0.143	0.027	0.260*	-0.018	0.145*	-0.007		0.000	0.000
11	0.011	-0.024	-0.085	-0.011	-0.013	0.111*	0.095*	0.129*	0.148*		0.035
12	0.058*	-0.021	0.017	-0.021	0.094*	0.071*	0.138*	0.085*	0.086*	0.028*	

*: Valores con un grado de significancia $p < 0.05$.

En la figura 13 se presenta el análisis de diferenciación genética realizado con el programa ARLEQUIN V3.5.1.2 (Excoffier y Lischer, 2010), utilizando 321 secuencias concatenadas de 4 genes mitocondriales (COI I, COI II, 16S y Región control), obtenidas de los organismos de las 11 zonas de la Región de Magallanes y Antártica Chilena. El tono azul más oscuro representa los valores más altos del índice de fijación ϕ_{st} , (análogo F_{st}). Los valores variaron desde 0 hasta 0.4, y aunque algunos de los valores fue estadísticamente significativos los resultados indicaron que las diferencias genéticas entre las zonas es muy baja. Por lo anterior en este estudio se considera que no existen diferencias genéticas entre las zonas de muestreo.

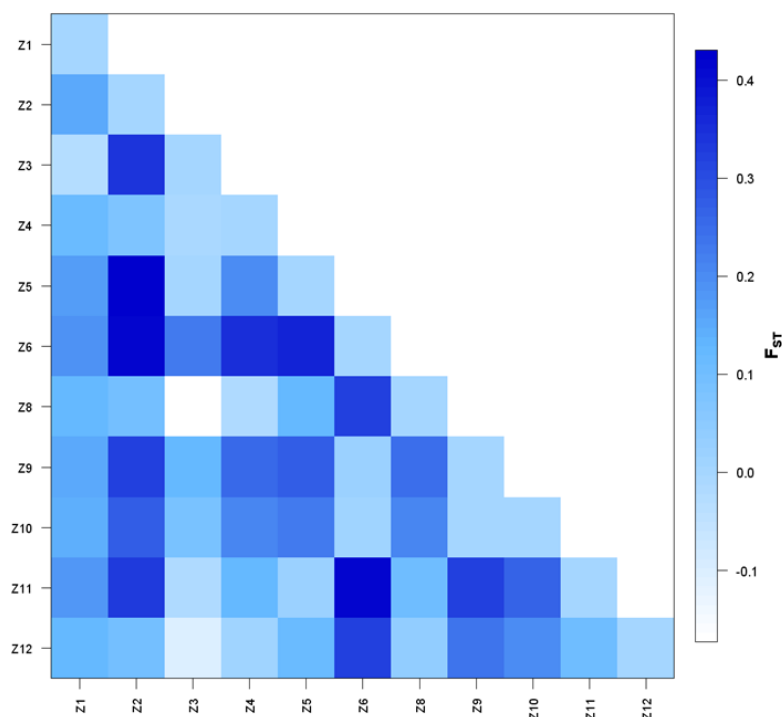


Figura 13. Matriz pareada con valores del índice de fijación ϕ_{st} (análogo al índice de fijación F_{st}) obtenidos del análisis de secuencias concatenadas de 4 genes mitocondriales de *L. santolla* (COI I, COI II, 16S y Región control). En los ejes X y Y se presentan las zonas y en el eje Z se presentan los valores del índice de fijación (ϕ_{st}). Fuente: ARLEQUIN V3.5.1.2 (Excoffier y Lischer, 2010).

7.5.2.2. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA).

Los resultados del Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) realizado utilizando las secuencias concatenadas de los 4 genes mitocondriales (COI I, COI II, 16S y Región control), se presenta en la tabla XIII.

Tabla XIII. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) utilizando las secuencias concatenadas de los 4 genes mitocondriales de *L. santolla* (COI I, COI II, 16S y Región control) de las 11 zonas de la Región de Magallanes y Antártica Chilena.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Componentes de Varianza	% de Variación
Entre grupos	10	8897.176	16.60539 (Va)	10.76
Entre poblaciones dentro de grupos	21	6290.809	23.23090 (Vb)	15.05
Dentro de poblaciones	289	33090.114	114.49867 (Vc)	74.19
Total	320	48278.100	154.33496	

Índices de fijación:

$F_{SC} = 0.16867$; $P = 0.0000$

$F_{ST} = 0.25812$; $P = 0.0000$

$F_{CT} = 0.10759$; $P = 0.0026$

Los valores de P fueron generados usando 10,000 permutaciones.

El Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) reveló que la estructuración genética entre los grupos (Zonas de muestreo) es muy baja (10.76%) y el nivel de significancia fue significativo (p -value >0.05). Asimismo, la estructuración tampoco se ubica entre las poblaciones dentro de los grupos, el porcentaje de variación obtenido fue de 15.05, el valor de significancia fue significativo (p -valor >0.05). En la tabla XII se aprecia que el mayor porcentaje de variación (74.19%) se presenta entre individuos, y el valor de significancia del estadístico fue significativo (p -valor < 0.05).

7.5.2.3. Prueba de Mantel.

Mediante el test o prueba de Mantel basado en 10000 permutaciones y utilizando 321 secuencias concatenadas de 4 genes mitocondriales (COI I, COI II, 16S y Región control), se evidenció que los organismos de *L. santolla* estudiados no presentan una estructuración geográfica, es decir, no existe una correlación entre las distancias genéticas y las distancias geográficas, en las diferentes zonas estudiadas de la Región Magallanes y Antártica Chilena. La línea de tendencia presenta un R^2 no significativo (Fig. 15) ($R^2 < 0.5$). Por lo tanto, no existe una estructura de aislamiento por distancia.

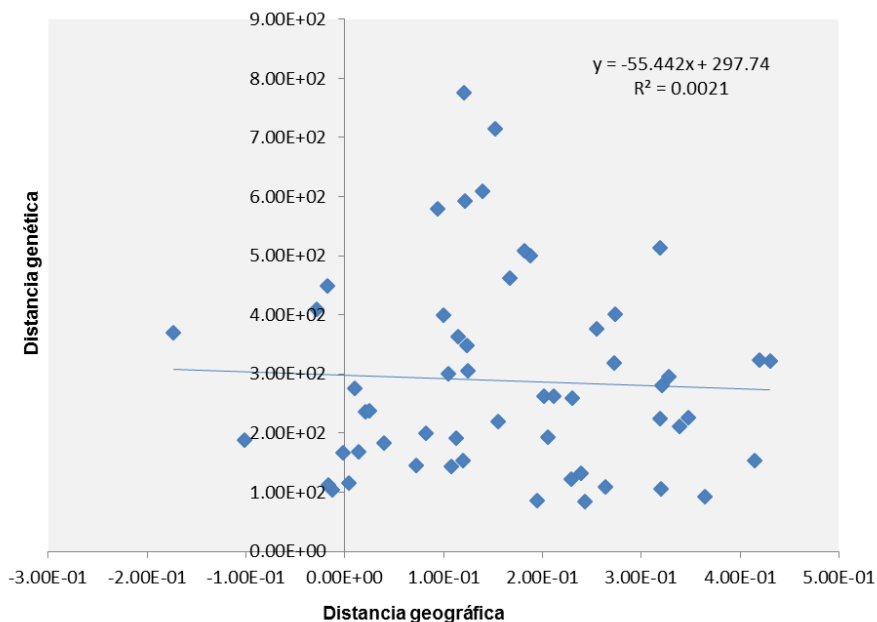


Figura 14. Prueba de Mantel de *L. santolla*. En el eje X se encuentran las distancias geográficas y en el eje Y las distancias genéticas entre los organismos de las 11 zonas de muestreo de la Región de Magallanes y Antártica Chilena. Se muestra también la línea de tendencia y el valor de R^2 .

8. DISCUSIÓN

El conocimiento sobre la diversidad y la estructura genética mediante marcadores moleculares ha sido una herramienta indispensable para el manejo en las pesquerías de especies marinas comerciales (Mustafa, 1999); sin embargo, para la centolla subantártica (*L. santolla*) de la Región de Magallanes y Antártica Chilena existe una limitada información genética disponible que pueda contribuir en la mejora del plan de manejo, por lo cual, en este estudio se analizó la variación y estructura genética de la centolla subantártica (*L. santolla*) mediante marcadores moleculares de tipo mitocondrial, realizando muestreos en embarcaciones centolleras artesanales en temporadas de pesca y no pesca, y con la meta de obtener un número representativo de muestras de las principales localidades representativas de la pesquería centollera de la Región de Magallanes y Antártica Chilena, definida por Guzmán Ríos en 1985.

Como parte de la planeación para lograr dicha meta, la Región de Magallanes y Antártica Chilena se dividió en doce zonas de norte a sur (Fig. 11), las cuales como una primera aproximación fueron comparadas entre ellas en los análisis genéticos.

Para evaluar la variación y la estructura genética de la centolla (*L. santolla*) en las zonas en que se dividió la Región de Magallanes y Antártica Chilena, se analizaron 9 fragmentos de genes mitocondriales (COI I, COI II, COI III, 12S, 16S, 18S, Región control, NADH-1, NADH-3) los cuales han sido utilizados exitosamente en estudios genéticos poblacionales de crustáceos decápodos (Sotelo, 2008; García, 2016; Ma *et al.*, 2011). Los primers (iniciadores de PCR) para analizar estos fragmentos mitocondriales se diseñaron a partir del genoma mitocondrial completo, el cual fue obtenido por el grupo de Genética y Genómica del Centro científico regional Fundación CEQUA (Acuña-Gómez *et al.*, En preparación).

Utilizar primers específicos conlleva la ventaja de obtener secuencias y datos más precisos, aunque la utilización de primers degenerados para la amplificación de *novo* de un gen, es una estrategia ampliamente utilizada para estudios genéticos poblacionales, sin embargo, el hecho de que no sean primers específicos para la especie en cuestión y que a su vez cuenten con bases degeneradas, podría ocasionar que estos se unan a fragmentos no deseados de otros transcritos, tanto como el número de combinaciones posibles lo permitan.

Otra desventaja de diseñar primers degenerados es que se necesita alinear una cantidad considerable de secuencias del gen que se desea amplificar, estas secuencias deben de ser de especies lo más cercanas posibles a la especie en estudio. Utilizar especies ontológicamente lejanas a la especie en estudio podría significar que los primers diseñados no amplifiquen el gen esperado por encontrarse diferencias en algunas de las bases o en la secuencia del transcrito, sin embargo, no siempre existen secuencias reportadas para especies cercanas a la especie en estudio.

La centolla subantártica (*L. santolla*) ha sido poco estudiada en aspectos genéticos, por lo cual la estrategia que se decidió utilizar en esta investigación de tesis para obtener primers específicos de la especie, fue utilizar las tecnologías de secuenciación de nueva generación (Next Generation Sequencing o NGS por sus siglas en ingles) de illumina, con la cual se logró obtener y caracterizar el genoma mitocondrial completo de *L. santolla* (Acuña-Gómez *et al.*, En preparación). Las secuencias obtenidas de cada gen analizado permitió obtener valores de los índices de diversidad y estructura genética dentro de los rangos reportados para otros crustáceos decápodos marinos (Aguilar, 2012; Ma *et al.*, 2011; Sotelo, 2008; Zelenina, 2008; Grant y Cheng, 2012). Y con base a la revisión de literatura realizada este es el primer estudio genético poblacional con mayor cobertura de análisis genético de la Región de Magallanes y Antártica Chilena, que utiliza marcadores moleculares de tipo mitocondrial específicos de *L. santolla*.

Las condiciones de amplificación mediante PCR punto final de cada uno de los fragmentos de genes mitocondriales analizados en este estudio fue exitosa (Tabla IV), y fue posible amplificar el 100% de las muestras de ADN extraído de tejido muscular de todos los organismos obtenidos (Tabla VI). El tamaño (pares de bases) de las secuencias obtenidas y alineadas variaron en el rango de 291 a 839 (Tabla VI), los cuales son adecuados para estudios genéticos poblacionales y coinciden con los usados en otros estudios de crustáceos decápodos (Aguilar, 2012; Ma *et al.*, 2011; Sotelo, 2008; Zelenina, 2008; Grant y Cheng, 2012). Después de realizar la alineación no se detectó ningún *gap* o brecha, lo cual es un indicador de una adecuada alineación (Hall, 2008). Todas las secuencias tuvieron un alto porcentaje de identidad con secuencias que corresponden a especies de crustáceos de la familia Lithodidae, la mayoría de los cuales son del género *Lithodes*, como *L. nintokuae*, *L. confundes* y el Cangrejo Rey *Paralithodes camtschaticus*, especie con la cual se realizó un análisis comparativo del genoma mitocondrial obtenido por el grupo de investigación del Centro Científico Regional Fundación CEQUA (Acuña-Gómez *et al.*, En preparación) con su genoma mitocondrial completo, el cual ya está publicado (Kim *et al.*, 2013). Para lo cual, el genoma mitocondrial completo obtenido de la centolla, fue ordenado y orientado en base al genoma mitocondrial de la especie *Paralithodes camtschaticus*, los contigs se unieron manteniendo entre estos un "gap" (representados por bases indeterminadas; Ns) acordes con el tamaño del genoma de referencia contra el que fueron alineados (*P. camtschaticus*). Los CDS o secuencias codificantes (del inglés, Coding Sequence) y los tRNAs predichos se ubicaron en dicho genoma el cual fue nombrado como LsGenomaMt (Genoma Mitocondrial de *L. santolla*), y empleando las coordenadas de su ubicación se generó un mapa del genoma mitocondrial (archivo comprimido CGView). Posteriormente "secuencias largas" y pares filtrados fueron ensamblados el sistema bioinformático llamado Newbler, (v2.9), utilizando la opción de scaffolding. Posteriormente se utilizaron las secuencias codificantes de cinco especies de crustáceos (*Paralithodes camtschaticus*, *Paralithodes brevipes*, *Cryptolithodes sitchensis*, *Pagurus*

longicarpus y *Austinogebia edulis*) y las predichas u obtenidas para la centolla y se construyó una super-matriz. Utilizando dicha matriz se realizó un análisis comparativo de relación filogenética con las cinco especies de crustáceos, con la meta final de validar la obtención del genoma mitocondrial de la centolla, los resultados de dicho análisis se presenta en la siguiente figura.

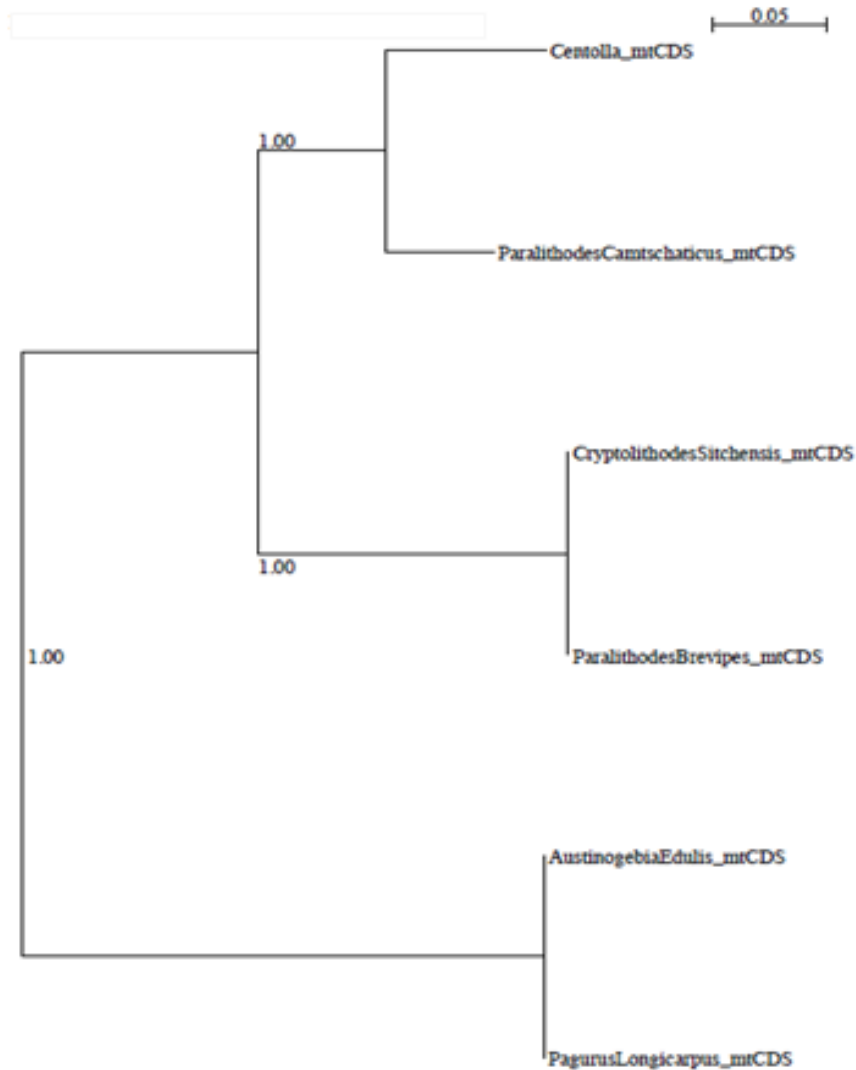


Figura 15. Comparativo de relación filogenética de cinco especies de crustáceos y la centolla (*L. santolla*), en base a las secuencias codificantes del genoma mitocondrial (mtCDS) de cada especie.

El análisis descrito anteriormente y los resultados del análisis de identidad de las secuencias (Tabla V) confirman que las secuencias obtenidas en este estudio a partir del ADN genómico extraído del músculo de los organismos muestreados corresponden a la especie *L. santolla* y todas fueron depositadas en el Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov). Lo anterior confirma que las secuencias son congruentes y que los fragmentos de los genes mitocondriales utilizados en este estudio son específicos de la especie *L. santolla* y permiten realizar análisis genético-poblacionales.

Paralithodes camtschaticus (Tilesius, 1815) o cangrejo real de Alaska puede ser usado como referencia de estudios genéticos poblacionales de centolla (*L. santolla*) debido a que presenta algunas características de vida similares y sobre todo es una especie que ha sido ampliamente estudiada desde hace tiempo dada su importancia comercial para las pesquerías del Pacífico, existiendo muchos estudios, tanto biológicos como genéticos. *Paralithodes camtschaticus* es la especie con mayor abundancia y distribución en el Pacífico Norte que se extiende desde el mar de Japón al norte de la Columbia Británica y dentro de los mares de Bearing y Chukchi (Grant y Cheng, 2012). Los adultos de *P. camtschaticus* al igual que los de *L. santolla*, realizan migraciones verticales temporales hacia aguas profundas para alimentarse y hacia aguas someras para la reproducción (Stone *et al.*, 1993). La reproducción es anual y las hembras llevan los huevos en su abdomen por 11 meses, presenta largos periodos de eclosión (2 a 3 semanas). Presentan cuatro estadios larvarios y una post-larva denominado glaucothoe (antes de convertirse en el primer cangrejo juvenil), a diferencia de *L. santolla*, las larvas son planctotróficas (que se alimentan del plancton) y pasan más de 80 días en la columna de agua hasta comenzar su vida bentónica. Alcanzan la madurez sexual a los 5-7 años de edad y son reclutados en la pesquería a partir de los 7-9 años (Stevens *et al.*, 2008).

Respecto a la identidad, todas las secuencias tuvieron un alto porcentaje de identidad que varían desde 73 a 99% con secuencias que corresponden a especies de crustáceos de la familia Lithodidae, la mayoría de los cuales son del género *Lithodes*, como *L. nintokuae*, *L. confundes* y el Cangrejo Rey *Paralithodes camtschaticus*. Estos valores de identidad son bastante parecidos a los reportados en otros estudios realizados en crustáceos decápodos para el gen mitocondrial, por ejemplo el estudio realizado con el gen COI del cangrejo de manglar *Ucides cordatus* por Ewal en 2006, en donde se encontró una identidad de 84% con genes COI del cangrejo *Portunus trituberculatus* (número de acceso en GenBank: AY303613) así como con otros crustáceos (*Celuca pugilator* AF466700, *Munida* sp. AY351029, *Gaetice depressus* AF317339, *Pseudocarcinus gigas* AY562127, *Hemigrapsus oregonensis* DQ022526).

La composición porcentual promedio de nucleótidos de las secuencias de los genes mitocondriales de *L. santolla* evaluadas en esta investigación fueron de 27.7% de timina (T), 26.6% de citosina (C), 27.9% de adenina (A) y 17.8% guanina (G), las cuales también son muy similares con otros crustáceos como es el caso del cangrejo de río *Potamonautes perlatus* cuyo gen de COI contiene 29.21 % de T, 23.33% de C, 25.88% de A y 21.52 de G (Daniels, 2003) y del anfípodo *Echinogammarus ischnus*, que tuvo 26,6 % de T, 20,7% de citosina (C) 24,9 de A y 17,8 % de G (Cristescu *et al.*, 2004), esto pone en relieve que los genes mitocondriales son bastante constantes en su composición nucleótida entre los crustáceos decápodos.

Adicionalmente, al igual que en casi todos los genomas mitocondriales de los crustáceos los marcos de lectura de las regiones codificantes de *L. santolla* (Acuña-Gómez *et al.*, En preparación) se ven interrumpidos por codones de paro; esto parece ser una característica conservada en todos ellos (Kim *et al.*, 2013).

Para determinar la variación genética todas las muestras fueron analizadas con 9 genes mitocondriales basados en primers diseñados para *L. santolla* (como fue descrito anteriormente), esto confiere mayores ventajas ya que muchas veces

cuando se utilizan primers diseñados para otras especies se obtienen bajos niveles de polimorfismo (variación genética). La diversidad genética de *L. santolla* obtenida en este estudio fue alta, lo cual fue determinado en base a un elevado número de haplotipos obtenidos, en los altos niveles de diversidad haplotípica ($Hd = 0.41 - 0.81$) y de diversidad nucleotídica ($\pi = 0.012-0.013$), obtenidos para todos los fragmentos de los 9 genes mitocondriales analizados.

Varias especies de crustáceos decápodos han sido objeto de estudio sobre la variabilidad genética poblacional a partir de datos genéticos de ADNmt principalmente con secuencias de la región control, de COI I, de 16S y 12S (Aguilar, 2012; Ma *et al.*, 2011; Sotelo, 2008; Zelenina, 2008; Grant y Cheng, 2012). Por ejemplo, la región control ha sido ampliamente utilizada en estudios poblacionales al ser un gen que evoluciona más rápido (4-5 veces) que el resto de la molécula del ADNmt (Moritz, *et al.*, 1987; Taberlet, 1996). Presenta regiones variables que son típicamente flanqueadas por sitios conservados (por ejemplo ADN ribosomal), para los cuales se pueden diseñar *primers*. Además, permite obtener una visión inicial de la estructura genética de especies no caracterizadas, y representa un método fácil de obtener información sobre la especie en estudio (Galtier *et al.*, 2009).

Existen otros genes mitocondriales como la Citocromo Oxidasa sub Unidad I, II y III, que han sido utilizados en el análisis de la diversidad y estructura genética de los crustáceos debido a sus características, ya que se considera que también cuentan con cierta actividad polimórfica, y aportan información sobre la condición genética de las poblaciones principalmente de especies para las cuales existe poca información genética. Los genes ribosomales que codifican la subunidad pequeña (12s), subunidad (18s) y subunidad grande (16s) de los ribosomas mitocondriales, este último cuenta con secuencias relativamente conservadas, es decir con una tasa de evolución más lenta por lo cual ha sido de gran utilidad en comparaciones genéticas a nivel de especie y género (Avice, 2004).

La historia evolutiva de un solo gen puede resultar diferente en un genoma entero, por lo tanto es importante analizar varios genes para tener una mejor integración en el análisis genético-poblacional. En este estudio se usaron varios de los genes mitocondriales más comúnmente usados en crustáceos decápodos (excepto el Cit-B) con los cuales se demostró que su diferente tasa mutacional proporciona información valiosa para los análisis genéticos poblacionales de una especie poco estudiada desde el punto de vista genético como lo es la centolla (*L. santolla*).

Los estudios genéticos de poblaciones realizados en lithodidos y específicamente en *L. santolla* son escasos. El lithodido conocido como “*Cangrejo Rey o Cangrejo de Alaska*” *Paralithodes camtschaticus* (Tilesius, 1815), es un organismo que ha sido ampliamente estudiado desde hace tiempo dada su importancia comercial para las pesquerías del Pacífico, existiendo muchos estudios, tanto biológicos como genéticos. Su alta cercanía a *L. santolla* (como fue descrita anteriormente al inicio de esta sección de discusión) la convierte en una referencia fundamental en la comparación u obtención de información biológica y genética. Para esta especie Zelenina *et al.*, en 2008, realizaron un estudio genético comparativo entre especies introducidas y especies nativas, en el cual se identificó el polimorfismo de un gen que codifica la citocromo oxidasa mitocondrial (COI) y cinco loci microsatélites nucleares en cuatro muestras del Mar de Barents y dos poblaciones de donantes de la Kamchatka Occidental y Primorie, observaron niveles de variación genética altos.

En el caso de la investigación realizada por Ewald (2006), en el gen COI del cangrejo *Ucides cordatus* la diversidad haplotípica fue de 0,97, siendo muy similar a la encontrada para el cangrejo *Ucides occidentalis* (0,9721); todos estos resultados muestran que la alta diversidad de haplotipos en el gen COI I y en varios de los genes mitocondriales es posible en invertebrados, como los crustáceos tipo cangrejo.

Para la centolla (*L. santolla*) destacan tres estudios genéticos principalmente. El primero realizado en el 2007 por Soto y colaboradores en el cual se realizó un análisis genético en la XII Región de Chile, a través de marcadores de ADN (RFLPs) y bioquímicos (allozimas). Los resultados indicaron que la población de *L. santolla* tiene altos niveles de diversidad genética, las allozimas son considerados marcadores que muestran un bajo polimorfismo y con bajo confiabilidad para detectar heterocigotos, y la información sobre la variabilidad genética puede considerarse poco confiable.

Un estudio reciente realizado en 2015 por Mejía-Ruíz, en el cual se hizo un análisis de la estructura poblacional y diversidad genética en la zona Norte, y Centro-Oeste de la Región de Magallanes y Antártica Chilena mediante el uso de 6 marcadores microsatélites con los cuales se identificó una alta diversidad genética en esas zonas.

En este estudio los resultados de los diferentes análisis fueron consistentes en detectar altos niveles de variación genética en las diferentes zonas de colecta, principalmente en las zonas ubicadas al norte de la región (Zonas 1 y 2) y en las zonas ubicadas al sur de la región (Zonas 8, 9, 10 y 12), a pesar de las diferencias en la tasa mutacional de los genes mitocondriales utilizados.

Una de las metas de esta investigación de tesis, fue aportar información importante al plan de manejo del recurso centolla de la Región de Magallanes y Antártica Chilena, ya que por la accidentada geografía y la existencia de diferentes cuerpos de agua y circulación en estos, es posible asumir la existencia de poblaciones genéticamente diferenciadas (stock pesqueros), con los cuales las medidas de regulación, manejo y conservación podrían considerar rotación de áreas extractivas y periodos diferenciales de veda. Y ante este desafío se planteó la siguiente hipótesis:

Si, el área de distribución de la centolla *L. santolla* en la Región de Magallanes y Antártica Chilena, está caracterizada por notorios accidentes geográficos (canales, fiordos, bahías, faldas de glaciares entre otros) y por diferentes niveles de explotación pesquera; entonces, existe en esta área de su distribución estructuración genética por aislamiento geográfico y diferentes niveles de variación genética.

Dado que esta especie se reproduce a lo largo de una extensa área dentro de las zonas semi-aisladas como son los fiordos y canales de la Región de Magallanes y Antártica Chilena se esperaba encontrar diferenciación genética y para evaluar nuestra hipótesis, se realizó una planeación estratégica que consistió en realizar un muestreo exhaustivo durante tres colectas en temporadas de pesca y no pesca, utilizando una embarcación artesanal centollera, que nos permitiera obtener muestras representativas de toda la Región de Magallanes y Antártica chilena de Norte a Sur incluyendo fiordos y canales, lo cual fue logrado exitosamente con las tres colectas (Fig. 11), ya que se logró obtener muestras de 69 localidades que son representativas de la pesquería centollera de la Región de Magallanes y Antártica Chilena, definida por Guzmán Ríos en 1985.

El análisis de todas las muestras con 9 genes mitocondriales no mostraron diferenciación genética significativa sugiriendo un amplio flujo genético, aunque los valores de ϕ_{st} (análogo a F_{st}) obtenidos están en el orden de 0 a 0.4.

Santos *et al.* (2007), mencionan que los niveles altos de variación genética parecen ser comunes en especies migratorias con poblaciones grandes y no estructuradas genéticamente, esto debido a que los tamaños efectivos poblacionales grandes y las altas tasas de migración minimizan el efecto de la deriva genética como una fuerza que reduce la diversidad genética (DeWoody y Avise, 2000). Avise *et al.* (1988), mencionan que en una población no estructurada genéticamente (que constituye una unidad genética) se espera que el nivel de diversidad genética sea proporcional al tamaño efectivo poblacional y a la tasa de

mutación, asumiendo que son constantes en el tiempo. A pesar de que en este estudio no se realizaron estimaciones de los tamaños poblacionales (N_e) ni de las tasas de migración, se puede asumir que el N_e de la centolla en la región estudiada es grande, sustentado esto también por el hecho de que ha soportado una fuerte explotación por varias décadas (desde el año 1930).

Respecto al análisis de AMOVA, la estructura genético poblacional de *L. santolla*, se determinó que esta es muy baja, pues del 100 % de variabilidad genética, 74.19 % se da entre los individuos dentro de las poblaciones y sólo 10.76 % de variabilidad se justifica por las diferencias entre poblaciones, con lo que se concluye que las poblaciones en las zonas de muestreo estudiadas son bastante similares y poseen baja estructuración genética, estos resultados coinciden con los obtenidos en el estudio realizado por Mejía-Ruiz (2015), en el cual se hizo un análisis de la estructura poblacional y diversidad genética en la zona Norte, y Centro-Oeste de la región de Magallanes y Antártica chilena mediante el uso de 6 marcadores microsatélites con los cuales se identificó una alta diversidad genética en esas zonas y se definió una unidad genética.

Los resultados del presente estudio también coinciden con el estudio realizado por Soto *et al.* (2007), en el cual se realizó un análisis genético en la XII Región de Chile, a través de marcadores de ADN (RFLPs) y bioquímicos (allozimas) y los resultados indicaron que la población de *L. santolla* es panmíctica, definida como una unidad genética.

Este conjunto de resultados obtenidos para la centolla subantártica (*L. santolla*), son contrarios a los resultados encontrados en el estudio realizado por Zelenina *et al.*, en 2008 para el cangrejo rey (*Paralithodes camtschaticus*) con un gen que codifica la citocromo oxidasa mitocondrial (COI) y cinco loci microsatélites nucleares en cuatro muestras del Mar de Barents y dos poblaciones de donantes de la Kamchatka Occidental y Primorie, en el cual se reportó que los niveles de

diferenciación genética poblacional se ven afectados por las corrientes marinas y las características geográficas de las zonas.

Estudios más recientes realizados en esta especie con marcadores microsatélites y secuencias del ADN mitocondrial, mostraron un gradiente en la diversidad entre las poblaciones del Noroeste del Pacífico y las poblaciones del Sur del Golfo de Alaska (Vulstek, 2011). Las poblaciones del Noroeste presentaron menor diversidad y estructura genética, que los autores asumieron se debía a la corriente costera de Alaska, que ocasiona un gran flujo de larvas planctónicas hacia las poblaciones situadas a lo largo de la costa del océano del Oeste del Golfo de Alaska, resultando en un mayor intercambio genético y evitando que las poblaciones se diferencien unas de otras. Las poblaciones del Sureste de Alaska tuvieron una alta estructuración genética debido al aislamiento provocado por la complejidad geográfica (fiordos y canales).

Existen varios factores que pueden influir en el grado de conectividad y/o en el de estructura genética de las poblaciones, los cuales han modelado la estructura genética poblacional de varias especies de crustáceos que constituyen recursos pesqueros y que se distribuyen en ambientes complejos como el cangrejo rey: el tipo de desarrollo larvario y la dispersión de estas por acción de las corrientes, la complejidad de la línea de costa y la dispersión o migración de adultos.

En el caso de la centolla se ha reportado que existen tiempos de eclosión y estadios larvarios prolongados, los cuales se estima que pueden durar 7 semanas y de 18 a 200 días para transformarse en un juvenil (centollita) bentónico (Vinuesa *et al.*, 1985; McLaughlin *et al.*, 2004). Se ha sugerido que los periodos largos de eclosión en los litodidos subantárticos son una estrategia para aumentar la dispersión y disminuir la depredación pelágica (Tathje *et al.*, 2003). Los resultados de este estudio sobre la baja estructuración genética encontrada sugiere que las larvas realizan movimientos de dispersión a lo largo de grandes distancias utilizando varios medios, por ejemplo se ha reportado la asociación de larvas y

juveniles a los discos de fijación del alga *Macrosystis pirifera*, la cual podrían utilizar como medio de dispersión cuando estas se desprenden (Tapella *et al.*, 2012). Lo anterior hace interesante iniciar estudios sobre los mecanismos de migración como los que se han determinado en el cangrejo rey de Alaska (*Paralithodes camtschaticus*) y que no han sido considerados para esta especie, ya sea en adultos o en etapas tempranas de desarrollo (fases larvarias), lo cual resulta un aspecto interesante de estudiar en una área tan compleja geográficamente como lo es la Región de Magallanes y Antártica Chilena.

También es probable que las larvas bentónicas-demersales de *L. santolla* tengan procesos de dispersión de distancias mayores a través de los fiordos por influencia de corrientes. Los fiordos están altamente influenciados por los vientos del oeste y del norte del frente polar, asimismo está influenciado por las aguas de las corrientes Circumpolar Antártica y Cabo de Hornos (Fig. 5); además la precipitación, la escorrentía continental y deshiele de glaciares, hacen de estos fiordos un gran ecosistema de aguas salobres. A diferencia de los fiordos de Alaska y Columbia Británica, los fiordos del sur de Chile presentan menos escurrimientos de agua dulce y por lo tanto cuentan con una compleja estructura de temperatura en la columna de agua (Pickard, 1971; 1973). Los fiordos tienen influencia marítima del Océano Atlántico y Pacífico por lo tanto el intercambio de aguas oceánicas y continentales, debido a las mareas es diferente en ambas entradas, occidental y oriental (Panella *et al.*, 1991).

Con base en la geomorfología de la Región de Magallanes y Antártica Chilena y de acuerdo a sus diferencias en tipo de formas de fondo en los perfiles submarinos y piedmonts, los fiordos chilenos se han dividido en tres zonas (Norte, Centro y Sur) (Fig. 6) (Araya-Vergara, 2006). La zona Norte, está constituida por sedimentos con estructura laminar (ritmitas), que morfológicamente corresponden a explanadas muy llanas producidas por represamiento de los sedimentos, ocasionalmente están alternadas con morrenas submarinas. La zona Central, presenta explanadas con capas laminadas horizontales de sedimentos, alternadas

con morrenas submarinas, denominadas bancos morrénicos y en la zona Sur, los fiordos tienen relativamente baja profundidad, siendo generalmente, los menos profundos de toda la zona austral. Estas características hacen establecer la posibilidad de permitir la dispersión de larvas de *L. santolla* del Norte hacia el Sur.

Los resultados del presente estudio y los obtenidos en el crustáceo *Cancer pagurus* (F_{st} global de 0.002) a lo largo de 890 kilómetros dentro de los fiordos y canales del sur de Chile, refuerzan la necesidad de realizar estudios genéticos y su asociación oceanográfica de varias especies que habitan en fiordos y canales de la Región de Magallanes y Antártica Chilena.

Adicionalmente, la habilidad de dispersión de adultos que se ha descrito en *L. santolla* también puede estar estrechamente relacionada con los resultados sobre estructura genética obtenidos en este estudio, lo cual es sustentado por otros estudios realizados en cangrejos (Ungfors *et al.*, 2009). Para el caso de *L. santolla* se ha propuesto una colonización de juveniles y adultos de esta especie en fiordos y canales a través de las aguas profundas en mar abierto cuando realizan las migraciones (Stevens, 2014). En estudios recientes sobre el cangrejo Rey *Paralithodes camtschaticus* (Windsland, 2014), se observó una dispersión de las larvas de esta a lo largo desde la costa del norte de Noruega, en la dirección hacia el este, llevado por el Atlántico hacia el este de Noruega y corriente costera noruega y una baja pero también considerable dispersión hacia el este (Pedersen *et al.*, 2006). Además de las larvas también se observó que los organismos adultos se encontraban en zonas alejadas a las de su distribución actual, observando la gran capacidad de sobrevivir en una amplia gama de condiciones físicas, además de tener un alto nivel de variabilidad genética y reproducción (Jorstad *et al.*, 2007; Jewett y Onuf, 1988; Otto *et al.*, 1990; Hjelset *et al.*, 2012; Windsland, 2014), lo que sugiere un alto potencial para la adaptación a nuevos entornos. Su capacidad de reproducción es también alta. Por consiguiente, el éxito de la invasión y posterior ampliación de las poblaciones de cangrejo real no debería ser una sorpresa. Por lo tanto es probable considerar que *L. santolla* al ser

una especie íntimamente ligada con el cangrejo rey, puede presentar las mismas conductas y características de *Paralithodes camtschaticus* y por lo anterior no sorprender con los amplios rangos de dispersión con los que cuenta, sin embargo es necesario realizar más análisis en este sentido. Por lo anterior son necesarios estudios de marcado-recaptura en donde se reporte el potencial de dispersión de adultos de esta especie combinados con estudios genéticos en donde se evalué el flujo genético.

Los trabajos realizados por varios investigadores (Ewald, 2006; Oliveira, 2009; Cottens, 2009; Britto *et al.*, 2011) respecto a la estructura genético poblacional de *Ucides cordatus* en Brasil, han puesto de manifiesto invariablemente la baja estructuración genética poblacional de este cangrejo, tanto Ewald (2006) como Oliveira (2009) han mostrado que incluso poblaciones de cangrejos muy distantes (alejadas por más de 4500 km en la costa del Brasil) muestran poca variabilidad genética entre sus poblaciones, incluso esto se da entre poblaciones que se encuentran a ambos lados de la desembocadura del río Amazonas que podría suponer una barrera geográfica importante para dicha especie, estos autores justifican la falta de estructuración genética poblacional debido al flujo génico que se desarrolla por el transporte de larvas.

La carencia de estructura genética poblacional es explicado también por Britto *et al.* (2011), argumentando que se debe al flujo génico originado por la eficiente dispersión larval de *Ucides cordatus*, pues mientras que los estadios de zoea I y zoea II de este cangrejo son eurihalinos, los siguientes no lo son y es por ello que las larvas se ven obligadas a salir a mar abierto. Las larvas permanecen allí por espacio de 20 a 69 días (dependiendo de la temperatura y salinidad) hasta que se transforman en megalopas, mientras que están en mar abierto las larvas pueden ser transportadas por las corrientes (cuya velocidad es de 0,6 a 1,0 m/s) varios miles de kilómetros en un solo mes lo que permite un intercambio efectivo de genes portados por las larvas, de esta misma opinión es Cottens (2009), quien señala que las poblaciones de *U. cordatus* están conectadas por flujos de larvas

por lo que se denominan metapoblaciones meroplanctónicas, pues a pesar de que los adultos no se cruzan directamente pueden presentar una elevada similaridad genética con la consecuente carencia de estructura genética poblacional.

El análisis de Mantel realizado en este estudio en *L. santolla* ha mostrado que la distancia genética no está relacionada con la distancia geográfica, estos resultados coinciden con los trabajos como los de Ewald, (2006); Oliveira, (2009); Cottens, (2009); Britto *et al.*, (2011), quienes han reportado que poblaciones del cangrejo *Ucides cordatus* distantes más de 4500 km se muestran genéticamente similares, con lo cual evidencian que la distancia geográfica no es un factor que influya en la diferenciación genética de la centolla (*L. santolla*) en la Región de Magallanes y Antártica Chilena.

Con los resultados de este estudio se puede plantear la hipótesis de la existencia de un flujo genético no restringido en el área de estudio. Lo cual implicaría que existen mecanismos de migración como los que se han determinado en el cangrejo rey de Alaska (*Paralithodes camtschaticus*) y que no han sido considerados para esta especie, ya sea en adultos o en etapas tempranas de desarrollo (fases larvarias), lo cual resulta un aspecto interesante de estudiar en una área tan compleja geográficamente como lo es la Región de Magallanes y Antártica Chilena.

9. CONCLUSIONES

Con los resultados de esta investigación se puede concluir:

Que se rechaza la hipótesis planteada en esta investigación debido a que a pesar de que la Región de Magallanes y Antártica Chilena, está caracterizada por notorios accidentes geográficos (canales, fiordos, bahías, faldas de glaciares entre otros) y por diferentes niveles de explotación pesquera. **No** se encontró en esta área de su distribución estructuración genética por aislamiento geográfico, aunque si se encontraron diferentes niveles de variación genética.

Que existe alta diversidad genética y baja estructura genética poblacional en *L. santolla* en la Región de Magallanes y Antártica Chilena y que estos resultados son compatibles con los resultados mostrados por otros investigadores (Mejía-Ruiz, 2015) en la zona Norte y Centro-Oeste de la Región de Magallanes y Antártica Chilena.

Que los fragmentos de genes mitocondriales analizados mediante primers (iniciadores de la PCR) específicos de *L. santolla*, desarrollados en este estudio mostraron altos valores de diversidad genética dentro de los rangos reportados para otros crustáceos decápodos marinos.

Que se puede plantear la hipótesis de la existencia de un flujo genético no restringido en el área de estudio.

Que no existe relación entre la distancia geográfica y la distancia genética en *L. santolla*.

Que es necesario realizar estudios de demografía-histórica, tamaño efectivo poblacional y dinámica poblacional en esta especie.

Que los resultados de esta investigación pueden contribuir con información

importante para la toma de decisiones en los programas de conformación de pies de cría y de repoblamiento.

Que la alta diversidad genética contenida en algunas de las zonas del Norte y del Sur de la Región de Magallanes y Antártica Chilena, convierte estas regiones en lugares potenciales para la conservación y diseño de futuros planes de manejo genético para la especie.

10. PERSPECTIVAS

Las herramientas moleculares desarrolladas en esta investigación permiten contar con una perspectiva de los efectos de la sobre explotación a nivel genético en diferentes escalas temporales y permiten inferir si el recurso centolla presenta algunas características de extinción.

Estas herramientas deben ser combinadas con parámetros demográficos poblacionales (tasa de crecimiento poblacional, edad de primera madurez, coeficiente de crecimiento individual, fecundidad y longevidad) para tener un panorama de la dinámica poblacional a corto y largo plazo, así como estimar el grado de peligro de extinción del recurso centolla (*L. santolla*) sometidas a explotación desde 1930 y para el cual existen pocos datos disponibles.

Adicionalmente, se deben realizar monitoreos periódicos de la diversidad genética de los organismos y especialmente en este recurso pesquero que está bajo un régimen de explotación.

Al ser un recurso de nivel transnacional (es decir, es un recurso compartido por Chile y Argentina a través del canal de Beagle), las estrategias de manejo y conservación deben ser coordinados por ambos países, por lo que es importante establecer las relaciones genéticas entre centollas de aguas Argentina y Chilenas.

11. LITERATURA CITADA

- Aguilar, A. 2012. Range-wide and local drivers of genetic structure in an endangered California vernal pool endemic crustacean. *Conserv. Genet.* 13:1577–1588.
- Alarcón, R.G., R. Aedo, R. Galleguillos, R.V. Oyarzún. 2007. Investigación biológico pesquera recurso centolla y centollón, XII Región de Magallanes y Antártica Chilena. Informe Final. 215 pp.
- Aljanabi, S.M., I. Martínez. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Res.* 25: 4692-4693.
- Allendorf, F.W., G.H. Luikart, S.N. Aitken. 2013. *Conservation and the Genetics of Populations*. Wiley-Blackwell. Second Edition. USA. 624p.
- Antezana, T. 1999. Hydrographic features of Magellan and Fuegian inland passages and adjacent subantarctic waters. *Sci. Mar.* 63 (1): 23-34.
- Avise, J.C., R. Ball, J. Arnold. 1988. Current versus historical population sizes in vertebrate species with high gene flow: a comparison based on mitochondrial DNA lineages and inbreeding theory for neutral mutations. *Mol. Biol. Evol.* 5: 311-344.
- Avise, J.C. 1994. *Molecular markers, natural history, and evolution*. Chapman and Hall, New York. 511p.
- Ayala, F.J., J.A. Kiger. 1984. *Modern Genetics*, 2nd edition. Benjamin/Cummings: Menlo Park, California. 1012 p.
- Azuma, N., Y. Kunihiro, J. Sasaki, E. Mihara, Y. Mihara, D.H. Yasunaga, S. Abe. 2007. Genetic variation and population structure of Hair Crab (*Erimacrus isenbeckii*) in Japan Inferred from Mitochondrial DNA Sequence Analysis. *Mar. Biotech.* 10(1):39–48.
- Balakirev, E.S., Y.V. Fedoseev. 2000. Estimating allozyme genetic variability in red king crab *Paralithodes camtschaticus* Tilesius. *Russ. J. Genet.* 36: 860-866.
- Beaumont, A., K. Hoare. 2003. *Biotechnology and Genetics in Fisheries and Aquaculture*. Wiley-Blackwell. First edition. USA. 176p.

- Boschi, E.E., D.A. Bertuche, J.G. Wyngaard. 1984. Estudio biológico pesquero de la centolla (*Lithodes santolla*) del Canal Beagle, Tierra del Fuego, Argentina. Contrib. Inst. Nac. Invest. Des. Pesq. (INIDEP). 441: 7-72.
- Bohonak, A.J. 1999. Dispersal, Gene Flow, and Population Structure. Q. Rev. Biol. 74(1): 21-45.
- Boore, J.L. 1999. Animal mitochondrial genomes. Nucleic Acids Res. 27(8):1767-1780.
- Botsford, L., A. Hastings, S.D. Gaines. 2001. Dependence of sustainability on the configuration of marine reserves and larval dispersal distances. Ecol. Lett. 4: 144–150.
- Brooker, A.L., J.A.H. Benzie, D.B. Blair, J.J. Versini. 2000. Population structure of giant tiger prawn *Penaeus monodon* in Australian waters using microsatellite markers. Marine Biology, 136:149-157.
- Campodónico, I. 1971. Desarrollo larval de la centolla *Lithodes antarcticus* Jacquinet, en condiciones de laboratorio. (Crustacea, Decapoda, Anomura, Lithodidae). An. Inst. Pat., 2: 181-190.
- Caniupán, M., F. Lamy, C.B. Lange, J. Kaiser, H. Arz, R. Kilian, O. Baeza-Urrea, C. Aracena, D. Hebbeln, C. Kissel, C. Laj, G. Mollenhauer, R. Tiedemann. 2011. Millennial- scale sea surface temperature and Patagonian Ice Sheet changes off southernmost Chile (53°S) over the past 60 kyr. Paleoceanography. 26: 10p.
- Cárdenas, J., J. Gibbons, J. Oporto, M. Stutzin. 1987. Impacto de la pesquería de centolla y centollón sobre las poblaciones de mamíferos marinos de Magallanes, Chile. Ambiente y Desarrollo Chile 3:111-119.
- Carvalho, G.R., T.J. Pitcher. 1994. Molecular genetics in fisheries. Rev. Fish. Biol. Fisher. 4(3): 269-271.
- CITES-UNEP. 2011. Checklist of CITES species (CD-ROM). Ed. by G. CITES Secretariat, Switzerland, and UNEP-WCMC, Editor. Cambridge, United Kingdom.
- Cristescu, M.E.A., J.D.S. Witt, I.A. Grigorovich, P.N.D. Hebert, H.J. MacIsaac. 2004. Dispersal of the Ponto-Caspian amphipod *Echinogammarus ischnus*: invasion waves from the Pleistocene to the present. Heredity. 92(3): 197-203.

- Costello, C., D. Ovando, R. Hilborn, S.D. Gaines, O. Deschenes, S.E. Lester. 2012. Status and solutions for the world's unassessed fisheries. *Science*. 338: 517-520.
- Daniels, S. R. 2013. Examining the Genetic Structure Among Populations of the Common Cape River Crab *potamonautes perlatus* from River Systems in South Africa Reveals Hydrographic Boundaries. *Crust. Biol.* 23(4): 936–950.
- Daza, E., C. Vargas, L. Guzmán. 2012. Seguimiento Crustáceos Bentónicos en la Región de Magallanes. Informe Final. SUBPESA. 180 pp.
- Díaz, P. 1987. Situación de los Recursos Centolla y Centollón en la XII Región. Chile Pesquero 44: 37-41.
- Dixon, S.J., Y. Fedyshyn, J.L. Koh, T.S. Prasad, C. Chahwan, G. Chua, K. Toufighi, A. Baryshnikova, A. Hayles, K.L. Hoe, D.U. Kim, H.O. Park, G. Myers, A. Pandey, D. Durocher, B.J. Andrews, C. Boone. 2008. Significant conservation of synthetic lethal genetic interaction networks between distantly related eukaryotes. 105(43).
- Excoffier, L., H.E.L. Lischer. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Resours.* 10(3):564-567.
- Frankham R. 2005. Genetics and extinction. *Biol. Cons.* 126: 131-140.
- Frankham, R., J.D. Ballou, D.A. Briscoe. 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, Cambridge. 607p.
- Freeland, J. 2005. The evolution of population biology: past, present and future. *J. Biogeogr.* 32(11): 2039-2040.
- Galtier, N., B. Nabholz, S. Glémin. 2009. Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Mol. Ecol.* 2009. *Mol. Ecol.* 18(22):4541-50.
- García, F. 2006. *Genética Poblacional de Langostas Espinosas Panulirus spp. De Importancia Comercial en el Pacífico Mexicano*. Tesis de Doctorado. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste CIBNOR. 86p.
- Guzmán, L., E. Daza, C. Canales, S. Cornejo, J. Quiroz, M. González. 2004. Estudio biológico-pesquero de centolla y centollón en la XII Región. Informe final: Proyecto FIP 2002-15.

- Grant, S.W., E.S. Merkouris, H.G. Kruse, L.W. Seeb. 2011. Low allozyme heterozygosity in North Pacific and Bering Sea populations of red king crab (*Paralithodes camtschaticus*): adaptive specialization, population bottleneck, or metapopulation structure? ICES J. Mar. Sci. 1-8.
- Grant, W.S., W. Cheng. 2012. Incorporating deep and shallow components of genetic structure into the management of Alaskan red king crab. *Evol. Appl.* 5: 820-837.
- Guevara, M., L.E. Paternina, P. Blanco, M. Vertel. 2015. Comparación y utilidad de tres métodos de extracción de ADN a partir de potenciales vectores de enfermedades rickettsiales (Acari: Ixodidae) en Colombia. XXV Simposio Internacional de Estadística. 4p.
- Goyard, S., H. Segawa, J. Gordon, M. Showalter, R. Duncan, S. J. Turco, M. Beverley. 2003. An in vitro system for developmental and genetic studies of *Leishmania donovani* phosphoglycans. *Mol. Biochem. Parasit.* 130:31-42.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41:95-98.
- Hall, B.G. 2008. *Phylogenetics Trees Made Easy*. University of Rochester, Emeritus and Bellingham Research Institute. 3rd. Edition. USA. 233p.
- Hauset, L., R.D. Ward. 1998. Population identification in pelagic fish: the limits of molecular markers. In: *Advances in Mol. Ecol.* Ed. G.R. Carvalho. IOS Press, Amsterdam, 191-224.
- Hjelset, A.M., E.M. Nilssen, J.H. Sundet. 2012. Reduced size composition and fecundity related to fishery and invasion history in the introduced red king crab (*Paralithodes camtschaticus*) in Norwegian waters. *Fish Res.* 121:73-80. En: Windsland, K. 2014. The invasive red king crab (*Paralithodes camtschaticus*): Mortality, individual growth and dispersal in Norwegian waters. The Arctic University of Norway. 50p.
- Hernández, M.B. 1986. Situación y perspectiva de explotación del recurso. La Pesquería de la Centolla, XII Región. Sem IFOP-CORFO, 29-30 Mayo de 1986: 8 p.
- Hinojosa, I.A., E.R. González, E. Macaya, M. Thiel. 2010. Macroalgas flotantes en el mar interior de Chiloé, Chile y su fauna asociada con énfasis en peracarida y estados

tempranos de desarrollo de Decapoda (Crustacea). *Ciencia y Tecnología del Mar*. 33(2): 71-86.

Hutchinson, W.F., G.R. Carvalho, S.I. Rogers. 2001. Marked genetic structuring in localized spawning populations of cod *Gadus morhua* in the North Sea and adjoining waters, as revealed by microsatellites. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 223:251-260.

Instituto de Fomento Pesquero IFOP. 2014. Chile. 107p. <http://www.ifop.cl/>.

Ihssen, P.E., H.E. Booke, J.M. Casselman, N.R. McGlade, N.R. Payne, F.M. Utter. 1981. Stock Identification: materials and methods. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 38:1838-1855.

IUCN. 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013. 1. In: IUCN.

Jewett, S.C., C.P. Onuf. 1988. Habitat suitability index model: red king crab. *Biological Report*, 82: 34 pp. En: Windsland, K. 2014. The invasive red king crab (*Paralithodes camtschaticus*): Mortality, individual growth and dispersal in Norwegian waters. The Arctic University of Norway. 50p.

Jorstad, K. E., C. Smith, Z. Grauvogel, L. Seeb. 2007. The genetic variability of the red king crab, *Paralithodes camtschatica* (Tilesius, 1815) (Anomura, Lithodidae) introduced into the Barents Sea compared with samples from the Bering Sea and Kamchatka region using eleven microsatellite loci. *Hydrobiologia*, 590: 115-121. En: Windsland, K. 2014. The invasive red king crab (*Paralithodes camtschaticus*): Mortality, individual growth and dispersal in Norwegian waters. The Arctic University of Norway. 50p.

Kelly, R.P., S.R. Palumbi. 2010. Genetic Structure among 50 Species of the Northeastern Pacific Rocky Intertidal Community. *Plos One Multispecies Genetic Structure*. 5(1): 13p.

Kennish, M.J. 1986. *Ecology of Estuaries. Volume I. Physical and Chemical Aspects.* CRC Press Inc., Florida, 511p.

Kim, S., H.G. Choi, J.K. Park, G.S. Min. 2013. The complete mitochondrial genome of the subarctic red king crab, *Paralithodes camtschaticus* (Decapoda, Anomura). *Mitochondrial DNA* 24(4): 350-352.

- Kimura, M. 1953. "Stepping-stone" model of population. Annual report of the National Institute of Genetics Japan. 3: 62-63.
- Kocher, T.D., W.K. Thomas, A. Meyer. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86: 6196-6200.
- Knusten, H., P.E. Jorde, C. André, N.C. Stenseth. 2003. Fine-scaled geographical population structuring in a highly mobile marine species: the Atlantic cod. Mol. Ecol. 12:385-394.
- Leary, R.F., F. Allendorf. 1989. Fluctuating asymmetry as an indicator of stress: implications for conservative biology. Trends Ecol. Evol. 4: 214-217.
- Levin, L.A. 2006. Recent progress in understanding larval dispersal: new directions and digressions. Integr. Comp. Biol. 46: 282–297.
- Librado, P., J. Rozas. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics 25:1451-1452.
- Liu, Z.J., J.F. Cordes. 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. Aquaculture. 238: 1–37.
- Lopera-Barrero, N.M., J.A. Povh, R.P. Ribeiro, P.C. Gomes, C.B. Jacometo, T.S. Lopez. 2008. Cien. Inv. Agr. 35(1): 77-86.
- Lotze, H.K., M. Coll, A.M. Magera, C. Ward-Paige, L. Airoidi. 2011. Recovery of marine animal populations and ecosystems. Trends in Ecology & Evolution, 26:595-605.
- Lovrich, G.A. 1997. La pesquería mixta de las centollas *Lithodes santolla* y *Paralomis granulosa* (Anomura: Lithodidae) en Tierra del Fuego, Argentina. Invest. MarValparaíso. 25: 41-57.
- Lovrich, G.A., J. Thatje, J. Calcagno, K. Anger. 2007. Las centollas colonizan la Antártida. Ciencia Hoy. 17(99):22-33.
- Luttikhuisen, P.A., J. Campos, J. Bleijswijk, C.A. Peijnenburg, W. Henk. 2008. Phylogeography of the common shrimp, *Crangon crangon* (L.) across its distribution range. Mol. Phyl. and Evol. 46:1015–1030.

- Ma, H., C. Ma, L. Ma. 2010. Population genetic diversity of mud crab (*Scylla paramamosain*) in Hainan Island of China based on Mitochondrial DNA. *Biochem. Syst. Ecol.* 39:434-440.
- Machado-Schiaffino, G., D. Campo, E. García-Vázquez. 2009. Strong genetic differentiation of the Austral (*Merluccius australis*) across the species range. *Mol. Phyl. Evol.* 53:351-356.
- Madison D.R., W.P. Madison. 2011. Software MacClade, vers. 4.
- Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*: 209-220.
- Mejía-Ruiz, P. 2015. Estructura Poblacional y Diversidad genética en la centolla (*Lithodes santolla*) de la zona Norte y Centro-Oeste de la Región de Chile, mediante el usos de microsatélites. Tesis de Maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste CIBNOR. 91p.
- Moritz, C., T.E. Dowling, W.M. Brown. 1987. Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 18:269-292.
- Mustafa, S. 1999. Genetics in Sustainable Fisheries Management. Fishing News Books. Borneo Marine Research Unit. Kinabalu, Malaysia. 157p.
- McLean, J.E., D.E. Hay, E.B. Taylor. 1999. Marine population structure in an andadromous fish: life-history influences patterns of mitochondrial DNA variation in the eulachon, *Thaleichthys pacificus*. *Mol. Ecol.* 8:143-158.
- McKeown, P., W. Shaw, C. André. 2009. Lack of spatial genetic variation in the edible crab (*Cancer pagurus*) in the Kattegat – Skagerrak area. *ICES J. Mar. Sci.* 66: 462-469.
- McMillen-Jackson, A.L., T.M. Bert. 2004. Mitochondrial DNA variation and population genetic structure of the blue crab *Callinectes apidus* in the eastern United States. *Mar. Biol.* 145: 769–777.
- Moreno, L.A. 2007. Tamaño efectivo de la población. En: L. Eguiarte, V. Souza, X. Aguirre. *Ecol. Mol.* Instituto Nacional de Ecología. México. 63-86.

- Mulley, J.C., B.D.H. Latter. 1980. Genetic variation and evolutionary relationship within a group of thirteen species of penaeid prawns. *Evolution* 34:904-916.
- Nei, M., F. Tajima. 1981. Genetic drift and estimation of effective population size. *Genetics* 98:625-640.
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. New York: Columbia Univ. Press. New York. 512 pp.
- Ovenden, J.R. 1990. Mitochondrial DNA and marine stock assessment: a review. *Aust. J. Mar. Freshwater Res.* 41: 835- 853.
- Otto, R.S., R.A. Macintosh, P.A. Cummiskey. 1990. Fecundity and other reproductive parameters of female red king crab (*Paralithodes camtschatica*) in Bristol Bay and Norton Sound, Alaska. In: S. Keller, editor. *Proceedings of the International Symposium on king and Tanner crabs*. Fairbanks, AK: Alaska Sea Grant College Program, University of Alaska Fairbanks. International symposium on king and Tanner crabs, Anchorage, Alaska, pp. 65–90.
- Palstra, F.P., D.E. Ruzzante. 2008. Genetic estimates of contemporaru effective population size: what can they tells about the importance of genetic stochasticity for wild population persistence? *Molecular Ecology*, 17: 3428-3447.
- Pedersen, O.P., E.M. Nilssen, L.L. Jørgensen, D. Slagstad. 2006. Advection of the red king crab larvae on the coast of North Norway - A Lagrangian model study. *Fish. Res.* 79: 325-336.
- Reuschel, J., F. Roßler, D.Y.P. Henriques, K. Fiehler. 2010. Testing the limits of optimal integration of visual and proprioceptive information of path trajectory. *Exp. Brain. Res.* 209:619–630.
- Rocha-Olivares, A., R.D. Vetter. 1999. Effects of oceanographic circulation on the gene flow, genetic structure, and phylogeography of the rosethorn rockfish (*Sebastes helvomaculatus*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 56:803-813.
- Rodríguez-Romero, A., P.P. Ponce, B. Peteira, M. Suris. 2011. Evaluación de tres protocolos de extracción de ADN en insectos del orden thysanoptera. *Rev. Prot. Veg.* 26 (3):187-190.

- Roldan, M.I., J.L. García-Marín, F.M. Utter, C. Pla. 1998. Population genetic structure of European hake, *Merluccius merluccius*. *Heredity*. 81:327-334.
- Roldan, M. I., S. Heras, R. Patellani, F. Maltagliati. 2009. Analysis of genetic structure of the red shrimp *Aristeus antennatus* from the Western Mediterranean employing two mitochondrial regions. *Genetica*. 136:1-4.
- Rousset, F. 2008. Genepop: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Mol. Ecol. Resour.* 8(1): 103-106.
- Santos, M.C., M.L. Ruffino, I.P. Farias. 2007. High levels of genetic variability and panmixia of the tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816) in the main channel of the Amazon River. *J Fish Biol.* 71(Suplement A): 33-44.
- Seeb, J.E., G.H. Kruse, L.W. Seeb, R.G. Week. 1990. Genetic structure of red King crab populations in Alaska facilitates enforcement of fishing regulations. In *Proceedings of the international symposium on King and tanner crabs: November 28-30, 1989, Anchorage, Alaska*. AK-SG-90-04, pp. 491-502. Alaska Sea Grant: Fairbanks, AK, 633p.
- Sievers, H.A., N. Silva. 2006. Masas de agua y circulación en los canales y fiordos australes. *Comité Oceanográfico Nacional*. 53-58p.
- Smith, P.J., R.I. Francis, M. Mcveagh. 1991. Loss of genetic diversity due to fishing pressures. *Fish. Res.* 11: 309-316.
- Stevens, B.G., S. Persselin, J. Matweyou. 2008. Survival of blue king crab larvae, *Paralithodes platypus*, in cultivation: Effects of diet, temperature, and density. *Aq Res.* 39: 390-397.
- Stevens, B.G. 2014. *King Crabs of the World: Biology and Fisheries Management*. CRC Press Taylor & Francis Group. U.S. 636p.
- Stepien, C.A., T.D. Kocher. 1997. Molecules and morphology in studies of fish evolution. En: T.D. Kocher y C.A. Stepien (Eds.): *Mol. Syst. Fish.*: 1-11. Academic Press. San Diego. 314p.
- Soto, M., S. Astete, S. Ferrada, R. Galleguillos. 2007. Análisis genético en *Lithodes santolla* (Molina 1782) (Crustacea: Decapoda), a través de marcadores de ADN e isoenzimáticos. *Biol. Res.* 40 (Suplemento A): R206.

- Sotelo, G., P. Morán, L. Fernández, D. Posada. 2008. Genetic variation of the spiny spider crab *Maja brachydactyla* in the northeastern Atlantic. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 362:211–223.
- Subsecretaría de Pesca y Acuicultura. Gobierno de Chile. 2009. Informe Técnico (R. PEsq.) N° 123. Suspensión Temporal del Acceso a la Pesquería de Centolla de la XII Región, 2009-2014. 19p. http://www.subpesca.cl/publicaciones/606/articles-12190_recurso_1.pdf.
- Subsecretaría de Pesca y Acuicultura. Gobierno de Chile. 2013. Estado de situación de las principales pesquerías Chilenas, 2012. 55p. http://www.subpesca.cl/publicaciones/606/articles-12190_recurso_1.pdf
- Subsecretaría de Pesca y Acuicultura. Gobierno de Chile. 2014. Informe Técnico (R. Pesq.) N° 208/2014 Modificación Veda Biológica Centolla (*Lithodes santolla*), XIV, X, XI y XII Región, año 2014. 41p. www.economia.cl/transparencia/documentos/DTOEX865.pdf
- Taberlet, P. 1996. The use of mitochondrial of DNA control region sequencing in conservation genetics. En: Smith, T.B., R.K. Wayne. *Molecular genetic approaches in conservation*. Oxford University Press. 125-142.
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, S. Kumar. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol. Evol.*10:2731-2739.
- Templeton, R.A. 2006. *Population genetics and microevolutionary theory*. Wiley-Liss a John Wiley & Sons. Inc. Publication. United States of America. 72p.
- Thompson, J.D., T.J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, D.C. Higgins. 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25(24):4876-82.
- Thorpe, J.P., A.M. Solé-Cava, P.C. Watts. 2000. Exploited marine invertebrates: genetics and fisheries. *Hidrobiología.*420:165-184.
- Palero, F., P. Abelló, E. Macpherson, C.A. Matthee, M. Pascual. 2010. Genetic diversity levels in fishery-exploited spiny lobsters of the genus *Palinurus* (Decapoda: achelata). *J. Crust. Biol.* 30(4): 658-663.

- Palumbi, S.R. 1994. Genetic divergence, reproductive isolation, and marine speciation. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 25:547-572.
- Palumbi, S.R. 2004. Marine Reserves and ocean neighborhoods: The Spatial Scale of Marine Populations and their Management. *Annu. Rev. Environ. Resour.* 29:31–68p.
- Panella, S., A. Michelato, A., R. Perdicaro, G. Magazzù, F. Decembrini, P. Scarazzato. 1991. A preliminary contribution to understanding the hydrological characteristics of the Strait of Magellan: Austral Spring 1989. *Boll. Ocean. Teor. Appl.* 9 (2- 3): 107-126.
- Pérez–Barros, P., V.A. Confalonieri, P. Kurt, G.A. Lovrich. 2015. Incongruence between molecular and morphological characters in the southern king crabs *Lithodes santolla* and *Lithodes confundens* (Decapoda: Anomura). *Polar Biol.* 13p.
- Pickard, G.L. 1971. Some physical oceanographic features of inlets of Chile. *J. Fish. Res. Bd.*, 28: 1077-1106.
- Pickard, G.L. 1973. Water structure in Chilean fjords. In: R. Fraser (ed.), *Oceanography of the south Pacific 1972, New Zealand Nat. Comm. for UNESCO, Wellington.* pp. 95-104.
- Piñero, D., A. Barahona, L. Eguiarte, A. Rocha-Olivares, R. Salas-Lizana. 2008. La variabilidad genética de las especies: aspectos conceptuales y sus aplicaciones y perspectivas en México. En: Conabios (ed.). *Capital Natural de México. vol 1: Conocimiento de la Biodiversidad.* México 415-435.
- Servicio Nacional de Pesca (SERNAPESCA). 1977. Anuario estadístico de pesca. Servicio Nacional de Pesca.
- Valenzuela-Quiñonez, F. 2014. Genética y dinámica poblacional de la totoaba (*Totoaba macdonaldi*, Gilbert, 1891) en el Golfo de California. Tesis de Doctorado. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, CIBNOR. 130 p.
- Vinuesa, J.H. 1984. Sistema reproductor, ciclo y madurez gonadal de la centolla (*Lithodes arcticus*) del Canal de Beagle, Tierra del Fuego, Argentina. *Contrib Inst Nac Des Pesq (INIDEP).* 441: 75-95.

- Vinuesa, J.H., L. Ferrari, R.J. Lombardo. 1985. Effects of temperature and salinity on larval development of southern King crab (*Lithodes antarcticus*). Mar Biol. 85(1): 83-88.
- Vinuesa, J.H., G.A. Lovrich, L.I. Comoglio. 1990. Growth of immature southern king crab (*Lithodes santolla*) in the Beagle Channel. Proc. Internat. Symp. King Tanner Crabs: 259-271.
- Vinuesa, J.H. 2000. La centolla ¿es un recurso sustentable?. Tercer Encuentro Internacional Patagónico para el Desarrollo Sustentable. 2-4 de Noviembre de 2000. 10p.
- Vulstek, S.C., T.P. Linderoth, J.R. Guyon, D.A. Tallmon. 2013. Spatio-temporal Population Genetic Structure and Mating System of Red King Crab (*Paralithodes camtschaticus*) in Alaska. 33(5):691-701.
- Wan, Q., H. Wu, T. Fujihara, S. Fang. 2004. Which genetic marker for which conservation genetics issue?. Electrophoresis. 25: 2165–2176.
- Weir, B.S., C.C. Cockerham. 1984. Estimating F-statistic for the analysis of population structure. Evolution. 38:1358-1370.
- Windsland, K. 2014. The invasive red king crab (*Paralithodes camtschaticus*): Mortality, individual growth and dispersal in Norwegian waters. The Arctic University of Norway. 50p.
- Wright, S. 1943. Isolation by Distance. Genetics. 28(2): 114-138.
- Yilmaz C., O. Ibrahim. 2002. Fish Population Genetics and Applications of Molecular Markers to Fisheries and Aquaculture: I Basic Principles of Fish Population Genetics. Turk. J. Fish. Aquat. Sci. 2: 145-155.
- Zhang, D., G. Ding, G. Wang, B. Tang, H. Sun. 2010. Structure and variable numbers of tandem repeats (VNTRs) of the mitochondrial control region in mitten crab *Eriocheir* (Crustacean: Brachyura). Mol. Biol. Rep. 38:4935–4940.
- Zelenina, D.A., N.S. Mogue, A.A. Volkov, V.I. Sokolov. 2008. Red King Crab: (*Paralithodes camtschaticus*) in the Barents Sea: A comparative Study of Introduced and Native Populations. Russ. J. Genet. 44(7): 859-866.
- FONDEMA <http://www.mares.cl/fondema1.php>.

12. ANEXOS

Anexo I. Preparación de soluciones para extracción de ADN de centolla.

- **TRIS-BASE-HCl 1M pH8**

Reactivo	Solución 50ml
Tris base	6.057 gr
HCl	2.1 ml
Aforar agua des-ionizada	50 ml

- **EDTA 0.5M pH8**

Reactivo	Solución 50 ml
EDTA	9.306 gr
KOH/NaOH	4 pellets
Aforar agua des-ionizada	50 ml

- **NaCl 5M**

Reactivo	Solución 50 ml
NaCl	14.61 gr
Aforar agua des-ionizada	50 ml

- **NaCl 6M Saturado**

Reactivo	Solución 50 ml
NaCl	17.538 gr
Agua destilada	25-30 ml
Aforar	50 ml

- **SDS 20%**

Reactivo	Solución 50 ml
SDS	10 gr
Aforar agua des-inizada	45 ml

- **SDS 10%**

Reactivo	Solución 50 ml
SDS	5 gr
Agua des-ionizada	45 ml

- **GEL AGAROSA 1%**

Reactivo	Cámara 7 x 7 cm y 7 x 10 cm
Agarosa	0.4 gr
TAE o TBE	80 ml

Cámara Biorad con capacidad máxima de 30 muestras.

El agar se mezcla con el TBE 1X y se calienta aproximadamente 30 segundos en el horno de microondas hasta que la solución sea totalmente transparente.

- **TBE 10X**

Reactivo	Solución 1000 ml
Tris Base	108 gr
Ácido Bórico	55 gr
EDTA	9.3 gr
Agua destilada	800 ml
Aforar a 1 litro	

Para correr los productos de amplificación o el ADN, el TBE se reduce a una concentración 1 X.

- **BUFFER DE LISIS (50 ml)**

Buffer de Lisis	Solución 50 ml
NaCl 5M	1 ml
Tris pH8 1M	2.5 ml
EDTA pH8 0.5M	10 ml
SDS 10%	5 ml
Aforar agua des-inozada	50 ml

TODOS LOS REACTIVOS DEBEN PREPARARSE BAJO CALOR CON AGITADOR MAGNETICO Y MEZCLAR DE FORMA MANUAL.

- **ALCOHOL 70%**

Reactivo	Solución 50 ml
Alcohol 96%	36.46 ml
Agua destilada	13.55 ml

EN LA PREPARACIÓN DE ESTA SOLUCIÓN NO DEBE REALIZARSE BAJO CALOR.

En la preparación de los reactivos es importante considerar que el área de trabajo debe de estar totalmente limpia, para evitar la contaminación de los reactivos.

Anexo II. Protocolo Extracción ADN genómico (centolla), sales (Aljanabi y Martínez, 1997).

Reactivos para extracción	Volumen
Buffer de Lisis	400 μ l
Proteinasa K	200 μ l
NaCl 6M	400 μ l
Estanol absoluto	500 μ l
Agua MiliQ	100 μ l

Equipo

Termobloque

Centrifuga

Vortex

Espectofotómetro

Micropipetas

Speedvac

1. Incubar el tejido en 400 μ l de buffer de lisis y 20 μ l (20 mg/ μ l) de proteinasa K a 65°C por 4hrs, macerar e incubar toda la noche hasta que el tejido haya desaparecido.
2. Añadir 200 μ l de NaCl 6M saturado y agitar vigorosamente.
3. Incubar en hielo por 10 min.
4. Centrifugar a 10,000 rpm por 10 minutos.
5. Transferir con pipeta el sobrenadante (500-600 μ l) a tubo con 1 ml de etanol absoluto frío.
6. Invertir en tubo varias veces para precipitar el ADN. El ADN debe ser visible en

etanol, en ese caso transferir ADN a un tubo con 100 μ l de TE o agua grado molecular, continuar con el paso 8. Si el ADN no es visible centrifugar a 13,000 rpm 10 minutos y continuar con los pasos 7 y 8.

7. Lavar con etanol al 70% y centrifugar a 13,000 rpm 5 minutos, pos dos veces y resuspender con 100 μ l de agua grado molecular.
8. Correr en gel de agarosa 0.7% para verificar la extracción.
Cuantificar y llevar a concentración 110 ng

Anexo III. Reactivos utilizados para la amplificación de genes mitocondriales.

ADN 40 ng/ ml (Cantidad Cargada)	Productos de amplificación	Escalera plus invitrogen (sin diluir)	Buffer de carga 5 x green GoTaq
1 μ l	2 μ l	.5 μ l	2 μ l

Una vez Extraído el ADN, se observó la integridad del mismo por medio de la Electroforesis y se cargó 1 ml de ADN + 2 ml de de Buffer 5 X GoTaq. Al Buffer de carga se le Adicionó previamente 1 ml de Gel Green Acid Stain 10,000 X.

Para corroborar los tamaños de los productos de amplificación se utilizó una escales de 1kb plus Invitrogen 250 ng.

Anexo IV. Condiciones de PCR punto final para la amplificación de genes mitocondriales.

Condiciones de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) para la amplificación de los fragmentos de los 11 genes mitocondriales analizados de centolla (*Lithodes santolla*).

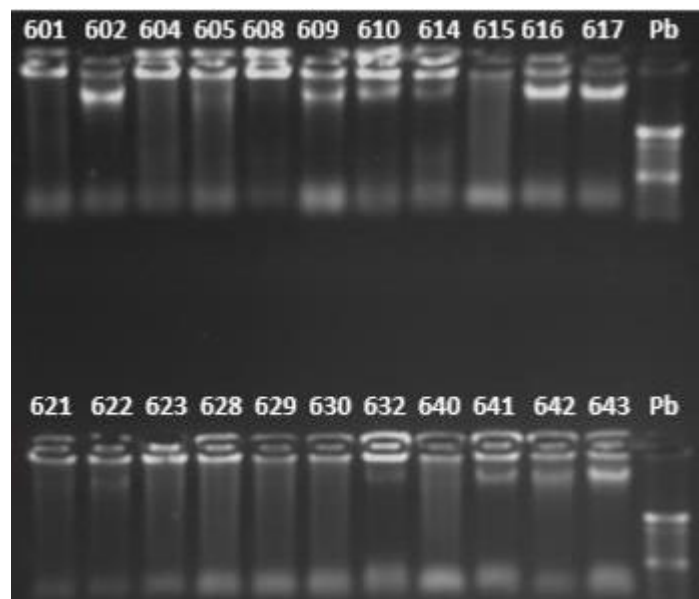
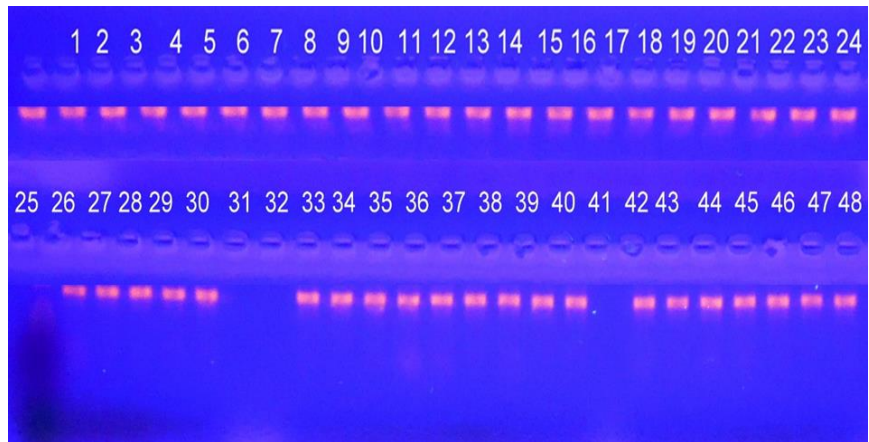
GEN	BUFFER	MgCl ₂	DNTP's	PRIMERS (F Y R)	ADN	TAQ POLIMERASA (unidades)	H ₂ O GM. (\square l)	V. F. (μ l)
COI-I	1 X	2.5 mM	10 mM	10 μ M	1	0.625	9.6	15
COI-II	1 X	2.5 mM	10 mM	10 μ M	1	0.625	9.6	15
COI-III	1 X	2.5 mM	10 mM	10 μ M	1	0.625	9.6	15
NADH-1	1 X	2.5 mM	10 mM	10 μ M	1	0.625	9.6	15
NADH-3	1 X	2.5 mM	10 mM	10 μ M	1	0.625	9.6	15
18S	1 X	2.5 mM	10 mM	10 μ M	1	0.625	9.6	15
28S	1 X	2.5 mM	10 mM	10 μ M	1	0.625	9.6	15
16S	1 X	2.5 mM	10 mM	10 μ M	1	0.625	9.6	15
12S	1 X	2.5 mM	10 mM	10 μ M	1	0.625	9.6	15
Región	1 X	2.5 mM	10 mM	10 μ M	1	0.625	9.6	15
Control								

BUFFER: 1 X de Buffer para PCR (MgCl); **H₂O GM:** Agua grado molecular; **VF:** Volumen final.

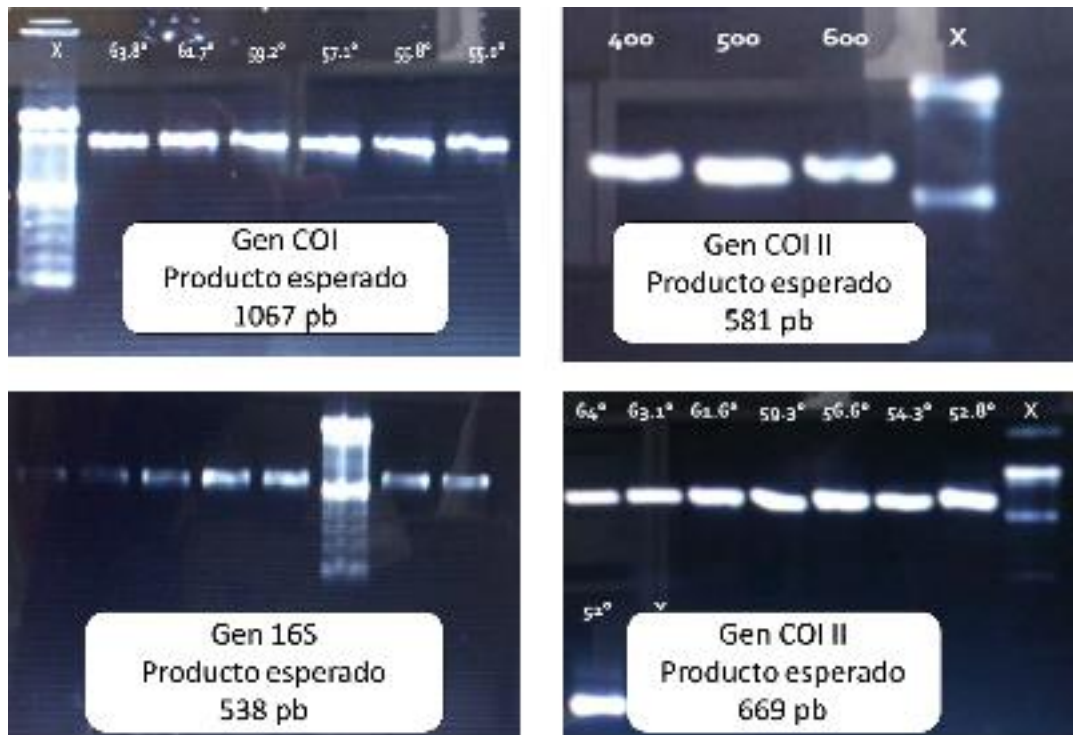
Condiciones de optimización (concentración de magnesio y temperatura de alineación de los primers) para la amplificación por PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa) de los 11 fragmentos de genes mitocondriales de centolla (*L. santolla*) analizados.

GEN	MgCl ₂	TEMPERATURA DE ALINEACIÓN
COI-I	2.5	63.8°C
COI-II	2.5	52.0°C
COI-III	2.5	64.0°C
NADH-1	3.0	52.7°C
NADH-3	3.0	59.0°C
NADH-6	2.5	57.6°C
18S	2.5	64.0°C
28S	2.5	64.0°C
16S	2.5	62.0°C
12S	2.5	62.0°C
Región	2.5	68.0°C
Control		

Anexo V. Gel de agarosa al 1% con extracciones de ADN de *L. santolla*.



Anexo VI. Amplificación de los fragmentos de genes mitocondriales de *L. santolla* COI, COI II, COI III, 16S.



Anexo VII. Amplificación de los fragmentos de genes mitocondriales de *Lithodes santolla* 18S, 28S, NADH1, NADH3.

